

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los
Alimentos**



TESIS DOCTORAL

**Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de
los microorganismos supervivientes a un proceso de acidificación**

MEMORIA PARA OPTAR AL GRADO DE DOCTORA

PRESENTADA POR

María Rosa Rodríguez Vargas

Directores

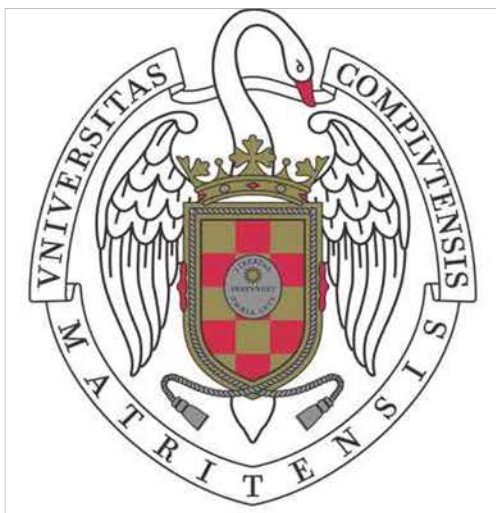
**Gonzalo D. García de Fernando Minguillón
Juan Salvador Aguirre García**

Madrid, 2016

UNIVERSIDAD COMPLUTENSE DE MADRID

FACULTAD DE VETERINARIA

**DEPARTAMENTO DE NUTRICIÓN, BROMATOLOGÍA
Y TECNOLOGÍA DE ALIMENTOS**



**VARIABILIDAD DE LA INACTIVACIÓN
MICROBIANA Y DE LA FASE DE
LATENCIA DE LOS MICROORGANISMOS
SUPERVIVIENTES A UN
PROCESO DE ACIDIFICACIÓN**

**Memoria que presenta Maria Rosa Rodriguez Vargas
para optar al grado de Doctor**

Directores

Dr. Gonzalo D. García de Fernando Minguillón

Dr. Juan Salvador Aguirre García

Madrid, 2015



**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología
de los Alimentos
Facultad de Veterinaria**

Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 3744. Fax: 91 394 37 43

GONZALO DOROTEO GARCÍA DE FERNANDO MINGUILLÓN, catedrático de
Tecnología de los Alimentos de este Departamento,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a un proceso de acidificación”**, presentada por Doña Maria Rosa Rodriguez Vargas para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del que suscribe, y autoriza su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal que se nombre a tal fin,

y para que conste a todos los efectos oportunos, firma el presente escrito en Madrid, a ocho de Octubre de 2015.

Fdo. Gonzalo D. García de Fernando Minguillón



**Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología
de los Alimentos
Facultad de Veterinaria**

Ciudad Universitaria, s/n. 28040 Madrid
Teléfono: 91 394 3744. Fax: 91 394 37 43

JUAN SALVADOR AGUIRRE GARCÍA,

CERTIFICA:

Que la Tesis Doctoral titulada **“Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a un proceso de acidificación”**, presentada por Doña Maria Rosa Rodriguez Vargas para optar al grado de Doctor, ha sido realizada en el Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Facultad de Veterinaria de la Universidad Complutense de Madrid, bajo la dirección del que suscribe, y autoriza su presentación para que pueda ser juzgada por el tribunal que se nombre a tal fin,

y para que conste a todos los efectos oportunos, firma el presente escrito en Madrid, a ocho de Octubre de 2015.

Fdo. Juan S. Aguirre García

AGRADECIMIENTOS

Quisiera expresar mi más sincero agradecimiento

A Lorenzo de la Hoz y Juan Antonio Ordóñez por darme la oportunidad de formar parte del mundo de la investigación y por la amabilidad mostrada en estos años.

A María Dolores Selgas, directora del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos durante el período de realización de este trabajo de investigación y por iniciarme en la docencia práctica.

A mis directores de Tesis, Gonzalo García de Fernando Minguillón y Juan Salvador Aguirre García, por su valiosa orientación durante la investigación y sobre todo por su apoyo y paciencia durante tantos años. A Juan, por transmitirme día a día y hora tras hora sus conocimientos en estadística, y a nivel personal, muchas gracias por tu amistad y por el apoyo incondicional, no podía haber tenido a mi lado a nadie mejor.

Un agradecimiento muy especial para Fernanda, Pablo, Aurora e Isabel por darme ánimos y buenos consejos.

Por supuesto, dar las gracias a todos los profesores del Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. A todos los compañeros de laboratorio y a quienes han pasado por él.

A mis amigas Slavi, Nina, Estrella, Rocío, Josefina, Elymar, Narel, Juanita. A mis amigos José, Edgardo, Felipe, con todos compartí momentos inolvidables. Mi agradecimiento especial a Felipe Cia por confiar en mí y abrirme las puertas de su casa.

A modo personal agradecer a mi familia, Máxima mi querida mami, que supo transmitirme seguridad y deseos de superación, a mi hermano Juan José, por aguantar mis malos momentos y tener siempre las palabras adecuadas para hacerme sonreír y sacarme de la melancolía y soledad que implica vivir en otro país. A la niña de mis ojos, Violeta, gracias por quererme y por ser tan positiva ante todo. A Mateo y Leandro, mis sobrinos, gracias por hacerme sentir especial los Domingo. Agradecer a Gualberto mi papi, aunque físicamente ya no está, es la luz que guía mis pasos allá por donde voy, y su constante recuerdo hace que no pierda la fe en el ser humano. A Jason, por todo el

cariño, amor, paciencia y apoyo incondicional que me ha entregado en el último periodo de esta tesis.

Y finalmente, agradecer a la Acción 4 del subproyecto PROCARTE del proyecto CARNISENUSA CSD2007-0016. Subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia. Proyectos Consolider Ingenio 2010, por concederme la beca que me ha permitido realizar esta tesis. Así como también a las subvenciones de diferentes organismos, todos ellos en régimen competitivo:

- Variabilidad de la destrucción microbiana y de la adaptación – fase de latencia – y de formación de biofilms de los microorganismos. Posible aplicación de los modelos a la industria alimentaria. AGL2005-01239. Subvencionado por el Ministerio de Educación y Ciencia.
- Tecnologías emergentes y procesado mínimo: aplicación a la seguridad química y microbiológica de alimentos listos para el consumo (RTE). S-0505/AGR-0314. Subvencionado por la Dirección General de Universidades e Investigación de la Consejería de Educación de la Comunidad de Madrid.
- Nuevos factores que pueden afectar a la variabilidad de la supervivencia microbiana y a la fase de latencia de bacterias supervivientes a procesos de conservación de alimentos. AGL2010-16598. Subvencionado por el Ministerio de Ciencia e Innovación.

RESUMEN

VARIABILIDAD DE LA INACTIVACIÓN MICROBIANA Y DE LA FASE DE LATENCIA DE LOS MICROORGANISMOS SUPERVIVIENTES A UN PROCESO DE ACIDIFICACIÓN

INTRODUCCIÓN

A la industria alimentaria se le exigen productos seguros, nutritivos, apetecibles y de uso cómodo y rápido. Aunar todos esos calificativos en un solo alimento es ardua tarea. Valgan dos ejemplos. Un tratamiento conservante intenso, de buenas perspectivas sanitarias, suele conllevar una pérdida de valor nutritivo y unas características sensoriales poco atractivas. El manejo de los alimentos para transformarlos en productos listos para el consumo implica la asunción de ciertos riesgos microbiológicos, mayores que los asumidos en productos sin manipulación. ¿Cómo responder ante el incremento de riesgos y peligros que se ciernen sobre los “nuevos alimentos”? Una alternativa que ha ganado correligionarios es la microbiología predictiva. Es una herramienta útil, a disposición de cualquier entidad interesada en los alimentos, que predice, mediante modelos matemáticos, el comportamiento microbiano bajo ciertas condiciones. La mayoría de los modelos disponibles predicen valores únicos (a cada valor de la variable independiente le corresponde un único valor de la dependiente); han demostrado su eficacia durante décadas a base de tratamientos sobredimensionados para salvaguardar la calidad microbiológica de los alimentos y predicen una media, sin considerar la variabilidad. Considérese un valor de reducción decimal, D , de 1 minuto. Si el producto contiene 10^3 ufc/g, un envase de 1 Kg que haya pasado por un tratamiento $6D$, contendrá 1 célula viable. Hasta aquí la predicción de un modelo clásico. Ahora piénsese en una producción industrial, miles de envases de 1 Kg/h. ¿Quién puede creerse que en todos ellos habrá 1 microorganismo superviviente? ¿No es más creíble que en unos no quedará ningún viable, en muchos 1, en otros 2, 3 y quizás en los menos 5 ó 6? Los modelos que no consideran la variabilidad microbiana predicen con precisión la tasa de crecimiento pero han fracasado en la predicción de la fase de latencia. Obviamente, esta fase del crecimiento microbiano es un factor crítico cuando se estima la vida útil de muchos productos y si quiere ajustarse a la realidad la fecha de consumo preferente, sin asumir pérdidas económicas al acortarla ni asumiendo riesgos derivados de la incertidumbre, hay que mejorar los modelos que la predicen. A partir de

estos antecedentes se propuso como objetivo de la línea de trabajo en la que está inmersa esta Tesis, el estudio, desde un punto de vista matemático, de la variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los supervivientes, con la finalidad de entender mejor la eficacia de los procesos de conservación de los productos alimenticios y contribuir con datos que, quizás, mejoren la precisión de los modelos del crecimiento microbiano.

MATERIAL Y MÉTODOS

En esta Tesis se ha abordado un tratamiento conservante implantado desde hace siglos, la acidificación y que en la actualidad se aplica profusamente en muchos alimentos, como sopas, cremas, gazpachos, pastas de tomate, encurtidos, escabeches, etc. Se ha estudiado la inactivación -y su variabilidad- mediante acidificación con diferentes ácidos y en distintos sustratos y la fase de latencia de los supervivientes -y su variabilidad- a tales tratamientos. Se ha trabajado con cuatro microorganismos relevantes en la microbiología de los alimentos: *Salmonella* Enteritidis, *Enterococcus faecalis*, *Pseudomonas fluorescens* y *Listeria innocua*. Se realizó un estudio previo de los parámetros cinéticos de inactivación en tampón citrato, agua de peptona/ácido acético y caldo de pollo/ácido acético. Una vez establecidas las condiciones de trabajo se estudió la variabilidad del número de supervivientes aplicando diferentes tratamientos para lograr distintos grados de inactivación (desde 0 hasta 4 ciclos logarítmicos) utilizando un gran número de muestras, al menos 50, todas ellas iguales. Para el estudio de la variabilidad de la fase de latencia de los supervivientes a los tratamientos acidificantes, los viables se diluían hasta obtener alícuotas que debían contener 1 célula. Tales muestras se incubaron a 20°C en el Bioscreen para finalmente estimar su fase de latencia, siempre con un elevado número de muestras, al menos 50, para disponer de una cantidad de datos que permitiera un análisis estadístico fiable.

RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Se ha comprobado que la inactivación microbiana mediante acidificación está sujeta a cierta variabilidad, que, afortunadamente, puede cuantificarse. Cuanto más intensos son los tratamientos conservantes, menor es el número de microorganismos que permanecen viables, pero más variable es su número. Este hecho adquiere relevancia si se persigue

un proceso que logre la total inactivación de un patógeno. Debe considerarse la variabilidad inherente al proceso conservante para aplicar un tratamiento suficiente que minimice el riesgo microbiológico hasta donde el tecnólogo quiera y no hasta que el azar pueda determinar caprichosamente. Además, y por supuesto, esta afirmación debe considerarse en cualquier análisis de peligros y puntos críticos de control y aplicarse en la evaluación cuantitativa de riesgos microbianos. Pasar por alto la variabilidad de la inactivación es una negligencia que puede llevar a resultados nefastos para la salud pública y la imagen y credibilidad de una empresa envuelta en un brote alimentario.

Como era de esperar, la intensidad de la acidificación afecta a la fase de latencia y la hace más larga y más variable en términos de su desviación estándar, pero de una forma proporcional a ella, es decir, al alargarse la fase de latencia, su variabilidad se mantiene en porcentaje, aunque el valor absoluto de la desviación estándar haya aumentado.

CONCLUSIONES

Es necesario disponer de un buen modelo que prediga, considerando siempre la variabilidad, tanto la probabilidad de supervivencia de una tasa microbiana determinada como la probabilidad de que la fase de latencia de esos supervivientes sea más o menos prolongada. Tal modelo se ha desarrollado en el contexto de esta Tesis y permite la obtención de distribuciones de probabilidad del número de supervivientes a un tratamiento acidificante y de su fase de latencia.

No cabe duda de que un buen modelado del comportamiento microbiano, tanto de la inactivación como del crecimiento, debe contemplar la variabilidad inherente a los organismos vivos. La inclusión de la variable “variabilidad” en tales modelos mejorará sus predicciones y su aplicación redundará en unas mayores garantías sanitarias de los alimentos.

SUMMARY

VARIABILITY OF MICROBIAL INACTIVATION AND LAG PHASE OF MICROORGANISMS SURVIVORS AND ACIDIFICATION PROCESS

INTRODUCTION

The food industry demands safe, nutritious, appealing products that are quick and easy to use. Meeting all these needs in a single food is often arduous task. It is worth giving a couple of examples. An intense preservative treatment, which has good health perspectives, often leads to a loss of nutritional value and not very attractive sensory characteristics. The food handling to transform them into products ready for consumption involves the assumption of greater microbiological risks than those taken in foods without such transformations. How can the increasing risks and hazards that threaten the "new food" be responded to? One answer that has justifiably gained a followers is predictive microbiology. It is a very useful tool, available to any entity interested in food, capable of using mathematical models to predict microbial behavior under certain conditions. Most models generated so far predict static -unique- values. To a value of an independent variable corresponds a unique value of the dependent variable. These static models that have proven successful for decades based on oversized treatments to safeguard the microbiological quality of food, predict an average, without considering the dispersion of data and its variability. For example, consider a value D of 1 minute. If the product contains 10 microorganisms per gram, a package of 1 Kg that has gone through a treatment of 6D, will contain 1 cell. Hitherto, this was the prediction of the classical model. Now, think of an industrial production of thousands of packs of 1 kg per hour. Who can believe that in all of them will be 1 surviving microorganism? Is not it more believable that some will not be viable at all, and in many there will be 1, in others 2 or 3 or perhaps at least 5 or 6? Moreover, models of microbial growth developed regardless of microbial variability predict with sufficient accuracy the growth rate but have failed in the prediction of lag phase. It is obvious that this phase of microbial growth is critical to estimating the shelf life of many products and if you actually conform to the best before date, without incurring economic losses to shortening it or assuming risks of uncertainty, you have to improve the predict models. Given this background, the proposal, as a general objective of the line of work in which this thesis is included, is the study, from a mathematical point of view, of the variability of inactivation and the lag phase of the survivors, with the

purpose of better understanding the effectiveness of preservation processes of foodstuffs and contribute data, perhaps to improve the accuracy of predictive mathematical models of microbial growth.

MATERIALS AND METHODS

This thesis addresses a preservative treatment used for centuries, which is that of acidification, now widely applied in the treatment of many foods, like soups, gazpacho, sauces, pickles, etc. Thus, it studies the inactivation -and its variability- by acidification with different acids and different substrates and the lag phase of survivors -and its variability- to such treatments. Four relevant microorganisms in food microbiology, *Enterococcus faecalis*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas fluorescens* and *Salmonella* Enteritidis, have been worked with. A previous study of the kinetic parameters of inactivation in citrate buffer, peptone water/acetic acid and chicken soup/acetic acid was performed. Once working conditions were established, the variability in the number of survivors by applying different treatments to achieve different degrees of decimal reduction (from 0-4 cycles) using a large number of samples, at least 50, was analyzed. Moreover, to study the variability of the lag phase survivors to the aforementioned preservative treatments, viables were diluted until aliquots only contained 1 cell. These samples were incubated at 20°C in the Bioscreen to finally estimate the lag phase, always with a large number of samples, at least 50, to have sufficient data to enable a reliable statistical analysis of both inactivation and lag phase.

RESULTS AND DISCUSSION

Microbial inactivation by acidification is subjected to some variability, which, fortunately, can be quantified. The more intensive preservative treatments are, the lower the number of microorganisms that remain viable but more variable its number. This fact becomes relevant if a process that achieves total inactivation of a pathogen is followed. The inherent variability in a preservative process should be considered when applying a treatment sufficient to minimize microbiological risk that the technologist wants and not leave it to chance. Furthermore, and of course, this conclusion must be considered in any analysis of hazards and critical control points and applied in

quantitative microbial risk assessment. Ignoring the variability of inactivation is a negligence.

As expected, the intensity of the acidification affects the lag phase and makes it both longer and more variable in terms of standard deviation, but proportional to it, that is, when extending the lag phase, their percentage change remains, although the absolute value of the standard deviation has increased.

CONCLUSIONS

Accuracy models to predict microbial behavior are necessary, which takes into consideration the variability. Models should predict both, the probability of a determined organism amount survives and the probability that the lag phase of these survivors is more or less prolonged. Such a model has been developed in the context of this thesis and allows the obtaining of frequency or probability distributions of the number of survivors to acidification and lag phases.

No doubt, a good model of microbial behavior of both, inactivation and growth, must consider the variability inherent in living organisms. The inclusion of the variable “variability” in such models improves predictions and their application will result in a stronger guarantee of the food safety.

ACRÓNIMOS

ACRÓNIMOS

ADN: Ácido Desoxirribonucleico

AESAN: Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición

Af: Factor de exactitud

AMP: Alimentos Mínimamente Procesados

APPCC: Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control

a_w : Actividad de agua

ATCC: American Type Culture Collection

ATP: Adenosín Trifosfato

atm: Atmósfera

Bf: Factor de sesgo

CECT: Colección Española de Cultivos Tipo

CV: Coeficiente de Variación

DO: Densidad Óptica

EFSA: European Food Safety Authority

ECDC: European Centre for Disease Prevention and Control

FAO: Organización de las Naciones Unidas para la Alimentación y la Agricultura

FDA: Food and Drug Administration

g: gramo

g: Tiempo de generación (h) o de duplicación de una población

h: Hora (tiempo)

HCl: Ácido clorhídrico

HTST: High Temperature for Short Time

ICMFS: International Commission of Microbiological Specification in Foods

kGy: Kilo-Gray

LPSN: List of Prokaryotic Names with Standing in Nomenclature

min: Minutos

ml: Mililitro

nm: Nanómetro (unidad de longitud de onda, que equivale a una mil millonésima parte de un metro)

N: Normalidad (Proporción o relación que hay entre la cantidad de soluto y la cantidad de disolvente)

N: Número de células (ufc/g ó ml)

NaCl: Cloruro de sodio

N_0 : Inóculo Inicial (ufc/g ó ml)

NTC: Norma Técnica Colombiana

OMS: Organización Mundial de la Salud

p : Valor p , valor de probabilidad que oscila entre 0 y 1

pH: Potencial hidrógeno

pKa: Logaritmo cambiado de signo de la constante de disociación ácida de un ácido débil

QMRA: Quantitative Microbial Risk Assessment

QS: Quorum sensing

RASFF: Rapid Alert System for Food and Feed

R^2 : Coeficiente de determinación

RMSE: Raíz del error cuadrático medio

RTE: Ready-To-Eat

Sd: Desviación estándar

SE: Error Estándar

seg: Segundo

ser: Serotipo

subsp: Subespecie

°C: Grados Celsius

T_d : Tiempo de detección

TSA: Agar Soja Trypticase

TSB: Caldo de Soja Trypticase

UHT: Ultra High Temperature

μ : Tasa de crecimiento (h^{-1})

ufc: Unidades formadoras de colonia

μl : Microlitros

μm : Micra

μ_{max} : Tasa máxima crecimiento (h^{-1})

WHO: World Health Organization (Organización Mundial de la Salud, OMS)

ÍNDICE

ÍNDICE

RESUMEN

SUMMARY

1 INTRODUCCIÓN	1
1.1 MICROORGANISMOS DE INTERÉS ALIMENTARIO	3
1.1.1 Breve apunte histórico	3
1.1.2 Datos de toxiinfecciones transmitidas por alimentos	4
1.1.3 Género <i>Listeria</i>	5
1.1.4 Género <i>Enterococcus</i>	7
1.1.5 Género <i>Salmonella</i>	8
1.1.6 Género <i>Pseudomonas</i>	10
1.2 CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS	11
1.2.1 Procedimientos utilizados en la conservación de alimentos	13
1.2.2 Compuestos químicos con propiedades antimicrobianas	16
1.3 ALIMENTOS Y ÁCIDEZ	19
1.3.1 pH y pK_a	19
1.3.2 Efecto del pH en el crecimiento de los microorganismos	21
1.3.3 El pH de los alimentos y su relación con los microorganismos	23
1.3.4 Actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos	26
1.3.5 Factores que afectan a la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos	29
1.3.6 Utilización de ácidos orgánicos en la industria alimentaria	32
1.4 ALIMENTOS MÍNIMAMENTE PROCESADOS (AMP)	35
1.5 MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA	37
1.5.1 MODELOS PREDICTIVOS	39
1.5.1.1 Clasificación de los modelos microbiológicos predictivos	40
1.5.1.1.1 Modelos empíricos y mecanicistas	41
1.5.1.1.2 Modelos cinéticos y probabilísticos	42
1.5.1.1.3 Modelos primarios, secundarios y terciarios	43

1.5.2 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE DATOS	47
1.5.2.1 Método de recuento de células viables	48
1.5.2.2 Método de turbidimetría	49
1.5.3 MÉTODOS PARA VALIDAR MODELOS PREDICTIVOS	52
1.5.3.1 Evaluación gráfica	54
1.5.3.2 Análisis matemático	55
1.5.3.2.1 Coeficiente de determinación (R^2)	55
1.5.3.2.2 Raíz del error cuadrático medio (RMSE)	56
1.5.3.2.3 Factor de sesgo (Bias factor, B_f) y factor de exactitud (Accuracy factor, A_f)	56
1.5.4 APLICACIÓN DE LA MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA	60
1.5.5 CRECIMIENTO E INACTIVACIÓN	61
1.5.5.1 Crecimiento bacteriano	61
1.5.5.2 Inactivación microbiana	63
1.5.5.3 Fase de latencia	64
1.5.5.4 Tiempo de generación	68
1.5.5.5 Velocidad de crecimiento	69
1.5.6 INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO	69
1.5.6.1 Temperatura	71
1.5.6.2 pH	72
1.5.6.3 Otros factores ambientales	73
1.5.7 VARIABILIDAD E INCERTIDUMBRE	74
2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS	81
3 MATERIAL Y MÉTODOS	87
3.1 MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO	87
3.2 OTROS MATERIALES	88
3.3 MATERIAL BIOLÓGICO	89
3.3.1 Muestras de caldo de pollo	89
3.3.2 Microorganismos	89

3.4 REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO	90
3.5 MÉTODOS MICROBIOLÓGICOS	91
3.5.1 Revitalización de los microorganismos y preparación del inóculo bacteriano	91
3.6 CONDICIONES EXPERIMENTALES	92
3.6.1 Inóculo inicial	92
3.6.2 Inactivación de los microorganismos mediante acidificación	93
3.6.3 Parámetros cinéticos de inactivación - valores D_{pH} y z_{pH}	94
3.7 ESTIMACIÓN DE LA FASE DE LATENCIA MICROBIANA	96
3.7.1 Bioscreen	96
3.7.1.1 Curvas de crecimiento en Bioscreen	98
3.7.1.2 Crecimiento a diferentes pHs	99
3.7.1.3 Cálculo de N_d y curvas de calibración de la concentración microbiana	100
3.7.2 Tiempo de detección (T_d)	101
3.7.3 Tasa máxima de crecimiento (μ_{max})	103
3.7.4 Fase de latencia	105
3.8 TRATAMIENTOS DE INACTIVACIÓN ÁCIDA	106
3.8.1 Variabilidad de la inactivación en tres sustratos	106
3.8.1.1 Distribución normal	109
3.8.2 Inactivación en TSB/HCl (0,5 N) y dilución de células supervivientes	112
3.8.2.1 Distribución gamma	115
3.8.2.2 Cálculo del tamaño del inóculo	117
3.9 ANÁLISIS DE DATOS	121
4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN	124
4.1 ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE INACTIVACIÓN (VALORES D_{pH} y z_{pH})	125
4.2 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DE LA INACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS MEDIANTE ACIDIFICACIÓN	135
4.2.1 Factores que influyen en la variabilidad de la inactivación ácida	143
4.2.2 Análisis de correlación y regresión	147

4.2.3 Análisis de varianzas – Test de Bartlett	152
4.3 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DE LA FASE DE LATENCIA EN MICROPOBLACIONES SOBREVIVIENTES A TRATAMIENTOS ACIDIFICANTES	158
4.3.1 Crecimiento microbiano en TSB a diferentes pHs	158
4.3.2 Estimación del número de bacterias (N_d) en el tiempo de detección (T_d)	161
4.3.3 Cálculo de la tasa de máximo crecimiento (μ_{max}) con el Bioscreen	165
4.3.4 Fases de latencia después de diferentes tratamientos acidificantes	170
4.3.5 Cálculo de la fase de latencia	173
4.3.5.1 Comparación de los valores obtenidos con tres alternativas para la estimación de inóculo: 1 Célula; Distribución de Poisson y Distribución Truncada de Poisson	190
4.4 EFECTO DEL TAMAÑO DEL INÓCULO EN LA FASE DE LATENCIA	194
4.4.1 Distribución gamma de la fase de latencia de células individuales	195
4.4.2 Comparación de las distribuciones de las fases de latencia	211
5 CONCLUSIONES	221
6 BIBLIOGRAFÍA	225

1INTRODUCCIÓN

El mejor científico está abierto a la experiencia, y ésta empieza con un romance, es decir, la idea de que todo es posible (Ray Bradbury).

1.1 MICROORGANISMOS DE INTERÉS ALIMENTARIO

1.1.1 Breve apunte histórico

Durante siglos el ser humano supo que los alimentos podían provocar enfermedades, aunque las causas les eran desconocidas. Durante el siglo X, una serie de intoxicaciones alimentarias, probablemente de origen microbiano, condujo a la promulgación de una ley. Así en el año 900 d.C., el emperador León VI de Bizancio proclamó un edicto que prohibía comer morcillas elaboradas con sangre embutida en estómagos de cerdo y conservadas mediante ahumado, ya que parecía probado que existía una relación directa entre la enfermedad y las morcillas. La etiología de la enfermedad era desconocida. En esa época, la creencia común era que los miasmas (unos vapores infecciosos) transmitían la enfermedad (Doyle y col., 2001).

A pesar de desconocerse la existencia de los microorganismos, la fermentación de alimentos era una práctica común desde tiempos inmemoriales. Fueron necesarios varios milenios desde que la humanidad comenzó a aprovecharse de tales seres microscópicos, para probar su existencia, hecho que sucedió a mediados del siglo XVIII. Hubo que esperar hasta finales del siglo XIX para que Robert Koch estableciera los criterios que demostraban que una bacteria causaba una enfermedad. Ya después, los conocimientos se fueron acumulando a marchas forzadas. La primera mitad del siglo XX estuvo marcada por el descubrimiento de los “tradicionales” microorganismos patógenos transmitidos por alimentos, sin contar las amebas y otros microorganismos en un peldaño evolutivo superior. Así se fue formando un grupo de denostados patógenos en el que se integraron *Brucella* spp., *Clostridium* spp., *Escherichia coli*, *Salmonella* spp., *Shigella* spp., *Staphylococcus aureus*, *Bacillus cereus* y *Vibrio* spp. En la segunda mitad del pasado siglo se han incorporado a esa lista negra otras especies consideradas, en un momento dado, “emergentes”, como *Campylobacter jejunii*, *Listeria monocytogenes*, *Yersinia enterocolitica*, *Aeromonas hydrophila*, *Chronobacter sakazakii* y diversos mohos toxico-génicos y virus, con lo que en los últimos años el número de patógenos reconocidos como transmitidos por alimentos se ha doblado (ICMSF, 2004; Montville y Matthews, 2009).

1.1.2 Datos de toxiinfecciones transmitidas por alimentos

En el informe anual sobre la situación de las zoonosis en Europa correspondiente al año 2012, publicado por la autoridad Europea de Seguridad Alimentaria (EFSA) y el centro Europeo para la Prevención y el Control de Enfermedades (ECDC), se indica que los casos de campilobacteriosis en humanos disminuyeron ligeramente en 2012 (por primera vez en 5 años), lo que supone un descenso del 4,3% comparado con los reportes de 2011; sin embargo sigue siendo la enfermedad zoonótica más frecuente, debido al elevado número de casos reportados, afortunadamente el número de muertes registrados por este microorganismo fue bajo (0,03%). Por otro lado se han notificado un total de 91.034 casos confirmados de salmonelosis en humanos en la UE. Esto representa un descenso del 4,7% por séptimo año consecutivo respecto a 2011, además de una baja tasa de letalidad de 0,14%. La disminución en la incidencia lleva produciéndose durante los últimos 7 años de forma consecutiva. Por el contrario, la incidencia de *Listeria* ha ido aumentando progresivamente en un 10,5% en los últimos cuatro años, con 1.642 casos confirmados de listeriosis. La transmisión más frecuente de este patógeno es durante el embarazo con un 79% de todos los casos confirmados. Respecto al tipo de alimento implicado en todos estos brotes, en primer lugar se encuentran los huevos y ovoproductos, carne de pollo fresca, comidas de buffet, alimentos listos para comer, verduras, pescados y productos de la pesca (EFSA, 2013).

Recientemente las frutas y verduras han ganado notoriedad como vehículo de transmisión. Según el informe del Sistema de Alerta Rápida para Alimentos y Piensos (RASFF) de la Unión Europea, en 2011 se ha constatado un aumento de las contaminaciones microbiológicas (en particular de *E. coli*, *Salmonella* y *Campylobacter*) en estos productos, tanto enteros como cortados y mínimamente procesados (VI gama), y también en semillas germinadas y zumos sin pasteurizar (Revista Alimentaria Investigación Tecnología y Seguridad, 2013).

Los registros epidemiológicos anteriormente mencionados continúan subrayando la importancia de las especies *Listeria monocytogenes* y *Salmonella enterica* serovar Enteritidis y su relación con los alimentos como causantes de infecciones y toxiinfecciones y la conveniencia de impedir o, al menos minimizar la presencia de estos patógenos en los alimentos. Esta Tesis confía en aportar un granito de arena al

conocimiento para que la industria disponga de herramientas en su mano para comprender más y mejor la microbiología de sus productos y pueda ofrecer a los consumidores alimentos más seguros.

Este trabajo no solo contempla la vertiente sanitaria de la microbiología de los alimentos; también se ocupa de los alterantes. A continuación se incluye una escueta reseña de los microorganismos con los que se ha trabajado, todos ellos relevantes para la industria por unos u otros motivos.

1.1.3 Género *Listeria*

Las bacterias del género *Listeria* son pequeños bacilos Gram-positivos de extremos redondeados de 0,4-0,5 μm de diámetro y 0,5-2 μm de longitud. No forman cápsulas, ni esporos y son anaerobios facultativos. Gracias a unos pocos flagelos peritricos son móviles a 20-25°C, aunque no a 37°C. En términos generales pueden crecer en un amplio intervalo de temperaturas, entre 1 y 43°C, si bien su temperatura óptima de crecimiento está comprendida entre 30 y 37°C. Son psicrotrofos y toleran condiciones de acidez y de alcalinidad, siendo capaces de crecer entre pH 5,5 y pH 9,6 aunque crece óptimamente a pHs neutro o ligeramente alcalino (Sun y col., 1990; Swanson y Baer, 1995).

Las especies del género *Listeria* se encuentran en nichos muy dispares; son bastantes ubicuas. Además son bastante resistentes a condiciones disgenésicas y pueden desarrollarse en sustratos muy diversos y en amplios rangos de condiciones ambientales.

Se han aislado tanto del suelo como de aguas residuales, de vegetales en descomposición, de heces animales, de salas de mataderos así como de alimentos frescos, ahumados y congelados (Stuart y Welshemier, 1973; Fetherston y Perry, 1994; Swanson y Baer, 1995; Gregory y col., 1996). Las cepas del género *Listeria* presentan una gran capacidad para adherirse a superficies vivas e inertes y, requieren solo un corto espacio de tiempo para la unión e iniciar la adhesión (Keskinen y col., 2008). Sin embargo que es muy común su presencia formando biofilms. Por tanto, considerando todas estas características, no es de extrañar que se detecten en muchos alimentos y que puedan acceder a ellos en cualquier etapa de la producción. Por otra parte, y como ya se

ha señalado anteriormente, es de destacar el carácter psicrotrofo de muchas cepas de este género, incluyendo las de *Listeria monocytogenes*, lo que acrecienta los riesgos inherentes a su presencia en los alimentos. Afortunadamente, aunque ubicua y resistente, *L. monocytogenes* raramente se detecta en grandes cantidades. Su concentración ocasionalmente excede a unos millares de ufc por ml, g o cm² en las materias primas por lo que cualquier procesado conservante rebaja esa carga hasta unos niveles sanitariamente adecuados y compatibles con la vida útil que el tecnólogo haya establecido.

Desde 1926 hasta 1974 *Listeria monocytogenes* fue la única especie reconocida dentro del género *Listeria*. Pero actualidad en él se incluyen especies como: *L. innocua*, *L. denitrificans*, *L. fleischemannii*, *L. ivanovii* (con dos subsp.), *L. marthii*, *L. murrayi*, *L. rocourtiae*, *L. weihenstephanensis* y *L. welshimeri*. De las 10 especies *L. monocytogenes* es un patógeno bien reconocido y *L. ivanovii* se la considera potencialmente patógena, mientras que al resto se las califica de inocuas (Saxe y Revzin, 1979; Sun y col., 1990; Rocourt y col., 1992; LPSN bacterio.net).

Aunque los brotes de listeriosis atraen gran atención por la elevada mortalidad que conllevan, llegando hasta un 25% en algunos casos, el número de brotes de listeriosis humana puede considerarse esporádica, sobre todo si tenemos en cuenta la frecuencia con que se detecta el microorganismo. No está claro si esto se debe a la resistencia humana o a la baja patogenicidad de la mayoría de las cepas. Algunos individuos sanos son portadores asintomáticos de *L. monocytogenes*, desconociéndose el riesgo de que lleguen a padecer la enfermedad.

L. monocytogenes puede acceder al ser humano mediante los alimentos, cruza la barrera intestinal y como respuesta del sistema inmunitario, es fagocitada. Los microorganismos supervivientes viajan vía sangre hacia el cerebro y placenta, pudiendo causar septicemia, abortos, meningitis y meningoencefalitis. La tasa de mortalidad es del 20 al 25%. Las mujeres embarazadas, especialmente en el tercer trimestre, pueden experimentar únicamente síntomas parecidos a la gripe como resultado de la infección; algunas mujeres son portadoras asintomáticas de listerias de origen fecal y llevan a término el embarazo normalmente. *L. monocytogenes* también puede causar infecciones en recién nacidos y adultos inmunodeprimidos (Montville y Matthews, 2009).

1.1.4 Género *Enterococcus*

Los organismos del género *Enterococcus* son cocos Gram-positivos, no esporulados, anaerobios facultativos que se presentan individualmente, en pares o en cadenas. Hasta la fecha se admiten 50 especies (LPSN bacterio.net), siendo las más relevantes en el ámbito alimentario *E. faecalis* y *E. faecium*. Estos y otros representantes del género *Enterococcus* se encuentran ampliamente distribuidos por doquier, aunque uno de sus principales nichos, como es de suponer considerando su nombre, es el tracto gastrointestinal de animales y humanos. Las especies detectadas con más frecuencia en heces son *E. faecalis*, *E. faecium* y *E. durans*, siendo más frecuentes en heces animales de abasto que en las humanas. De todas las especies de *enterococcus* asociadas a los humanos, *E. faecalis* es la predominante (Foulquié y col., 2006). De todas maneras, este microorganismo debe considerarse ubicuo ya que no solo se aísla de animales de sangre caliente sino también del suelo, de aguas superficiales, plantas, verduras e insectos. Estos microorganismos se caracterizan por ser muy resistentes a ambientes disgenésicos incluyendo pHs alcalinos y elevadas concentraciones de cloruro de sodio. Además muchas cepas crecen en un amplio intervalo de temperaturas, desde temperaturas de refrigeración hasta los 45°C e incluso más, aunque el crecimiento óptimo suele cifrarse en torno a los 37°C. Su resistencia y su adaptabilidad a diversos sustratos y factores que condicionan el crecimiento implica que puedan encontrarse en muchos alimentos, sobre todo en los elaborados a partir de una materia prima que no se trate térmicamente, como la carne para fabricar embutidos crudos o la leche cruda para ciertos quesos, aunque también se detectan asiduamente en aquellos que se han higienizado, ya sea por su inherente resistencia a los tratamientos conservantes, ya como consecuencia de una contaminación post-tratamiento, pero, en estos casos, su concentración suele ser escasa. Por todo esto se les ha considerado unos buenos indicadores para valorar las condiciones higiénicas y de conservación de los alimentos y su posible contaminación a partir de aguas fecales o heces (Foulquié y col., 2006). Sin embargo, la presencia de *E. faecalis* y otros *enterococcus* en muchos alimentos no siempre se relaciona con una contaminación fecal, dejando en entredicho su papel indicador.

Algunos *enterococcus* se han propuesto como cultivo iniciador por presentar propiedades bioquímicas y tecnológicas interesantes para la producción de quesos y, en

menor magnitud, para la de derivados cárnicos (De Vuyst y col., 2003). Diversos estudios microbiológicos de quesos madurados elaborados en Grecia, Italia, España y Portugal han mostrado que los *Enterococcus* spp. juegan un papel relevante en su maduración, siendo las especies *faecalis*, *faecium* y *durans* las que desarrollan un papel más preponderante en las características finales de sabor y textura de los quesos. Su mecanismo de acción se debe probablemente a las actividades proteolíticas, lipolíticas y esterásicas desplegadas por algunas cepas de *Enterococcus*, así como su habilidad para metabolizar el citrato produciendo diacetilo y otros importantes compuestos volátiles (Franz y col., 2003; Manolopoulou y col., 2003; Foulquié y col., 2006; Morandi y col., 2006).

No obstante, la selección de *Enterococcus* para formar parte de un cultivo iniciador es una tarea difícil, debido a su riesgo potencial en la salud humana. Algunas cepas de *E. faecalis* y otros enterococos son patógenas oportunista sobre todo en ambientes hospitalarios, pudiendo causar infecciones del tracto urinario, en algunos casos endocarditis, incluyendo cuadros esporádicos de infecciones en el sistema nervioso (Vancanneyt y col., 2002; De Vuyst y col., 2003). Este carácter peligroso de los enterococos se ve acrecentado por el hecho de su demostrada resistencia a muchos antibióticos, lo que hace que estos microorganismos se encuentran entre los más frecuentes causantes de enfermedades nosocomiales junto a *Escherichia coli* y *Staphylococcus aureus* (García de Fernando, 2011).

1.1.5 Género *Salmonella*

Las salmonellas son los microorganismos patógenos más frecuentemente identificados como agentes etiológicos de toxiinfecciones alimentarias. Son muchos los alimentos y serotipos de salmonellas los implicados en infecciones humanas en países desarrollados, y en países en vías de desarrollo, tal como se ha constatado en las últimas décadas (Koohmaraie y col., 2005).

El género *Salmonella*, perteneciente a la familia *Enterobacteriaceae*, está constituido por bacilos Gram-negativos, anaerobios facultativos, generalmente móviles, debido a la presencia de flagelos peritricos. Las salmonellas pueden adaptarse a condiciones adversas, pueden utilizar una amplia variedad de sustratos orgánicos con

capacidad para metabolizar nutrientes por vía respiratoria o por fermentación. Las bacterias crecen óptimamente a 37°C y algunas cepas pueden crecer a elevadas temperaturas (hasta 54°C) mientras que otras muestran propiedades psicrotróficas, llegando a crecer en alimentos conservados entre 2 y 4°C, o mantenerse viables durante largos periodos de tiempo en alimentos almacenados y congelados. Son microorganismos resistentes a la deshidratación por lo que se mantienen viables en productos de baja actividad de agua. Además, su resistencia térmica aumenta a medida que disminuye la actividad de agua (a_w), por lo que no debe extrañar su presencia en leche en polvo. Recientemente también se ha demostrado que *Salmonella* spp. pueden adherirse y formar biofilms en superficies que se encuentran en las plantas de procesamiento de alimentos (entre las que se incluyen plástico, cemento y acero); esta capacidad se debe a que posee estructuras de superficie, como la SEF 17 fimbriae, que facilitan la adhesión a las superficies inanimadas, proporcionando a las células cierta capacidad de resistencia frente a fuerzas mecánicas (Joseph y col., 2001; Gonzáles, 2005). Esta respuesta adaptativa puede provocar un incremento de la resistencia de los microorganismos ante factores inactivantes como tratamientos térmicos, con conservantes, acidificación, etc. (Montville y Matthews, 2009).

Su pH óptimo de crecimiento se encuentra en torno a 6,5-7,5; aunque se ha observado su multiplicación en el intervalo de 3,6-9,5; estando el pH mínimo de crecimiento determinado por diversos factores ambientales, como la composición del medio de crecimiento, la temperatura y el tipo de ácido utilizado para la acidificación (Álvarez, 2009).

Según el esquema de clasificación las *Salmonellas* se dividen en dos especies *S. bongori* y *S. enterica* (con seis subespecies *arizonae*, *diarizonae*, *enterica*, *hutenae*, *indica* y *salamae*) (LPSN bacterio.net). La mayoría de *Salmonellas* aisladas del hombre y de animales pertenecen a *Salmonella enterica* subespecie *enterica*. Entre ellas cabe destacar las serovariedades *Salmonella* Typhymurium y *Salmonella* Enteritidis, por ser las más comúnmente asociadas con brotes de toxoinfección alimentaria (Álvarez, 2009; EFSA, 2013).

Es notorio que las fuentes más habituales de infección por *Salmonella* son los huevos crudos o poco cocidos y productos que contienen huevo, así como los pollos y

sus derivados. Este problema emerge a raíz del aumento global de la exportación de frutas y verduras frescas y deshidratadas procedentes de países que disfrutan de climas tropicales y subtropicales, en los que las condiciones higiénicas durante la producción, la cosecha y la distribución de los productos, no siempre cumplen unos estándares mínimos para los países importadores, por lo que la incidencia de los patógenos puede ser mayor que en otras circunstancias o en productos provenientes de otras zonas del mundo (Montville y Matthews, 2009).

Las salmonellas acceden al organismo por vía oral, por lo que deben sobrevivir a la barrera defensiva que representa la acidez gástrica antes de llegar a adherirse e invadir las células del epitelio intestinal, en las que finalmente se introducen y se multiplican. La fiebre entérica es una enfermedad humana grave asociada con dos cepas tifoideas y paratifoideas. Los síntomas aparecen después de un periodo de incubación que varía entre 7 y 28 días y puede incluir diarrea, fiebre aguda y prolongada, dolor abdominal, dolor de cabeza y un malestar generalizado (D'Aoust, 2001).

1.1.6 Género *Pseudomonas*

Los alimentos -perecederos- pueden alterarse durante su almacenamiento como consecuencia del desarrollo de muchas especies bacterianas. Considerando que dicho almacenamiento debe hacerse y se hace en condiciones de refrigeración, es indudable que son las bacterias psicrotrofas las responsables de la posible alteración; estos microorganismos pueden contaminar, colonizar y multiplicarse activamente en alimentos mantenidos a temperaturas bajas (incluso en las cercanías de 0°C), dando lugar a defectos de color o cambios de textura, malos sabores u olores u otras características que convierten al alimento en indeseable para el consumo. Es posible que el grupo bacteriano más relevante en este aspecto sea la Familia *Pseudomonadaceae* (con aproximadamente 212 especies), constituido por bacilos rectos o ligeramente curvos Gram-negativos, aerobios obligados, no esporulados, y móviles gracias a unos flagelos polares; algunas especies producen pigmentos, como por ejemplo, el amarillo-verdoso de *Pseudomonas fluorescens*, una de las especies más típicamente relacionadas con la alteración de alimentos frescos de origen animal. Los nichos más frecuentes de estas especies son sustratos naturales, como el suelo y el agua, aunque se detectan con

asiduidad en alimentos de muy diverso origen (Montville y Matthews, 2009; LPSN bacterio.net).

Por otra parte, algunas especies de *Pseudomonas* son capaces de producir biofilms, de forma que ofrecen mucha resistencia, y pueden sobrevivir, a procesos de lavado y desinfección, incluso tratamientos con antibióticos. Esto hace extremadamente difícil su eliminación de superficies contaminadas. Además, son muy resistentes a ciertas condiciones disgenésicas, pudiendo sobrevivir en sustratos con escasísimos nutrientes, durante largos periodos de tiempo (Díaz, 2011).

La temperatura óptima para su multiplicación depende mucho de la especie que se trate. Así, las patógenas, como *P. aeruginosa*, crecen óptimamente a temperaturas por encima de 37°C, mientras que las psicrotofas lo hacen a 25°C, teniendo problemas algunas de ellas para multiplicarse por encima de los 30°C. No crecen en condiciones ácidas ($\text{pH} \leq 4,5$), son sensibles al cloruro sódico y necesitan de un sustrato con elevada actividad de agua para su crecimiento. *Pseudomonas* es uno de los principales grupos responsables de las alteraciones de productos cárnicos, pescados, leche cruda y sus derivados y hortalizas almacenados en refrigeración. *Pseudomonas fluorescens* es, quizás, la bacteria que más deterioros provoca en todos estos alimentos (Adams y Moss, 2008).

El carácter patógeno de algunos integrantes del género *Pseudomonas* solo se pone de manifiesto en condiciones de inmunodeficiencia, por lo que se les considera patógenos oportunistas. El patógeno más importante es *P. aeruginosa*, que ocasiona procesos nosocomiales, pudiendo provocar neumonías, infecciones urinarias e incluso septicemia (Díaz, 2011).

1.2 CONSERVACIÓN DE LOS ALIMENTOS

Salvo contadísimas excepciones, todos los alimentos provienen de organismos vivos, y es precisamente esta naturaleza biológica una de las causas de una serie de transformaciones que pueden sufrir y, no solo van a modificar sus características originales, sino que también llegan a desencadenar su deterioro. En general, todos los alimentos son perecederos, unos más y otros menos, pero todos pueden alterarse por

causas microbianas, físicas o químicas. Ciñéndonos a las causas microbianas, se calcula que más del 20% de todos los alimentos producidos en el mundo se pierden por acción de los microorganismos (Casp y Requena, 2003).

Nuestros antepasados “inventaron” muchos métodos de conservación más o menos efectivos, que se emplearon durante siglos y aun se siguen utilizando. Las técnicas primitivas se desarrollaron a partir de la necesidad y la experiencia. Los métodos más comunes de conservación fueron el secado, ahumado, salado encurtido y, cuando las temperaturas eran suficientemente bajas, la congelación. Con frecuencia varios de estos métodos se utilizaban combinados, a veces inconscientemente, para obtener un producto que se mantenía mejor y durante más tiempo que el conservado por un único método. Por ejemplo, la carne y el pescado se conservaban por una combinación de desecación y ahumado. Los alimentos tradicionalmente conservados en áreas del Norte eran carnes y pescados secados, salazones y ahumados, frutas y hortalizas secadas, encurtidas o fermentadas. En los climas tropicales, aunque era más probable disponer de alimentos frescos durante todo el año, estos se deterioraban rápidamente por el calor imperante, con frecuencia antes de ser consumidos. Empíricamente, algunos de estos alimentos comenzaron a “conservarse” merced a la actividad de microorganismos inocuos que excluían a los causantes de alteraciones y de procesos patológicos. El proceso que “descubrieron” se conoce hoy como fermentación y los ejemplos más conocidos son, sin duda, la producción de alcohol por acción de las levaduras a partir de carbohidratos y la de ácido a partir de los mismos sustratos por la actividad de las bacterias lácticas. El encurtido de alimentos en vinagre tiene un efecto similar al de la fermentación, pero en lugar de esperar la formación de ácido por la actividad microbiana, se añade directamente el ácido -por regla general vinagre, que también fue fruto de la acción microbiana- al alimento fresco. El encurtido se aplicó sobre todo en hortalizas, pero también fue tradicional en algunas zonas la conservación por este sistema de carnes y pescados (Casp y Requena, 2003).

La conservación de alimentos, en su contexto más amplio puede definirse como la aplicación de tecnologías encargadas de prolongar la vida útil y disponibilidad de los alimentos para el consumo humano y animal, protegiéndoles de microorganismos patógenos y otros agentes responsables de su deterioro. El objetivo es mantener, e incluso mejorar, sus características nutritivas, sensoriales e higiénicas, es decir, prevenir

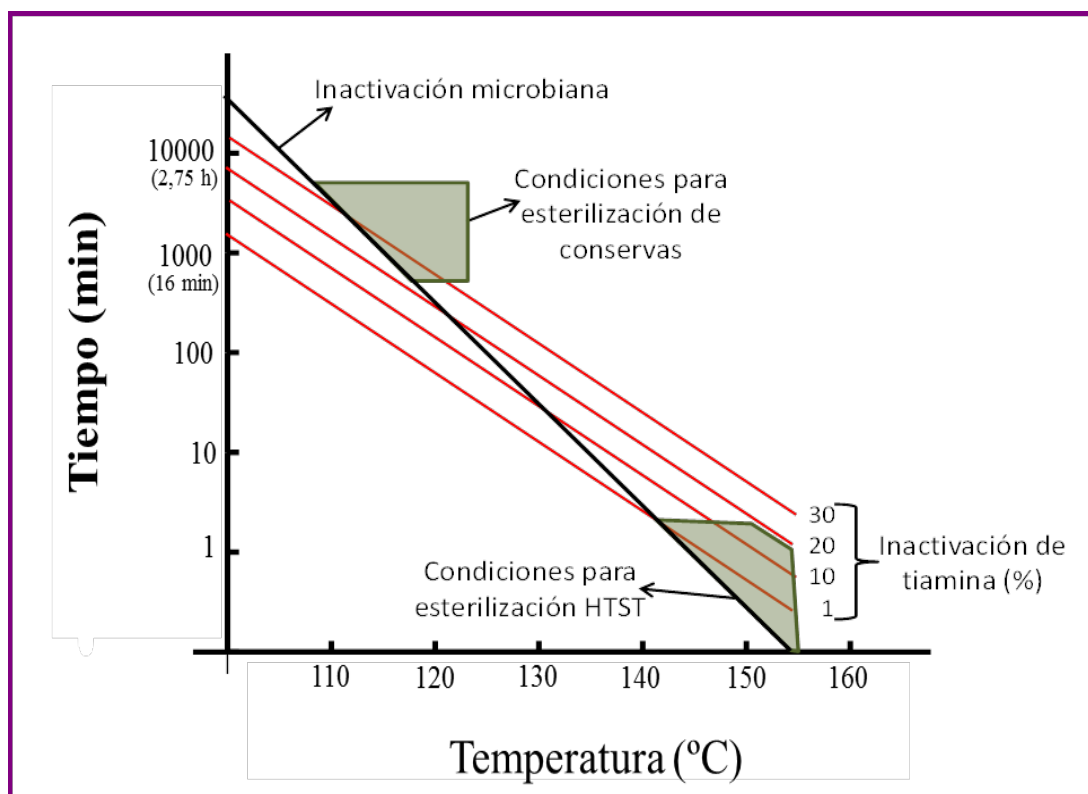
cualquier transformación que implique un menoscabo de la calidad -nutritiva, higiénica y sensorial- del alimento, e intentar mantener su estado original durante su almacenamiento. La conservación comercial de alimentos no se estableció hasta principios del siglo XIX, después de una serie de descubrimientos que permitieron sentar las bases científicas y técnicas para dicha conservación. Aún hoy en día, los métodos de conservación de los alimentos que han llevado a cabo durante miles de años tales como la salazón, desecación, o en su término más científico, deshidratación, fermentación y el encurtido siguen siendo operaciones que controlan las poblaciones microbianas en los alimentos. No cabe duda que el aporte de las nuevas tecnologías en la transformación, conservación y, los avances en el campo de envases y sistemas de envasado, han hecho y hacen posible que los alimentos puedan tener una vida útil incluso más prolongada (McMeekin y col., 2002; Herrero y Romero de Ávila, 2006; Aguilar, 2012).

1.2.1 Procedimientos utilizados en la conservación de alimentos

La conservación de alimentos no es una novedad. Desde hace más de diez mil años existen métodos de conservación que se han ido entendiendo y perfeccionando a lo largo del tiempo. No fue hasta el siglo pasado cuando se llegaron a comprender y controlar realmente todas las variables que influyen en la inactivación microbiana y pudo garantizarse la inocuidad de los alimentos procesados desde una perspectiva científica. Pero dichas garantías, en muchas ocasiones, producen unos cambios en el valor nutritivo y en las propiedades sensoriales de los alimentos que el consumidor ha acabado por objetar, por lo que la industria alimentaria se ha visto en la necesidad de desarrollar procesos de conservación menos agresivos para los nutrientes y la calidad sensorial, pero tratando de mantener intacta la calidad higiénica de los alimentos. Esto ha supuesto un notable avance en lo que se refiere a diferentes técnicas de conservación (Cubero y col., 2002). Las operaciones de conservación más frecuentes en la industria alimentaria son:

- Tratamientos térmicos, (termización, escaldado, pasteurización y esterilización). Cualquiera de ellos va a menoscabar el valor nutritivo de los alimentos. Obviamente, cuando menos intenso sea el tratamiento, mejor será la calidad sensorial del alimento, aunque no debe olvidarse que la inactivación microbiana no corre paralela a las modificaciones químicas que pueda sufrir el alimento. La Figura 1 es un clásico

ejemplo que muestra el efecto microbicida y la inactivación de tiamina en leche a diferentes tratamientos esterilizantes. Los procesos UHT (Ultra High Temperature) o HTST (High Temperature for Short Time) “cuidan” más los nutrientes que la esterilización hidrostática. Por otra parte la desnaturalización de las proteínas es más rápida cuando se aplica vapor saturado (calor húmedo) que cuando se calientan mediante aire caliente (calor seco).



Fuente: Fellows (2009)

Figura 1. Efecto de diferentes tratamientos térmicos en la inactivación microbiana y la de tiamina. HTST. High temperature, short time.

- La aplicación de frío es una herramienta muy utilizada para combatir el desarrollo microbiano. La refrigeración lo frena y la congelación lo para. La refrigeración prolonga la vida útil de los alimentos y, si la que se le asigna al producto es la adecuada, su calidad sensorial y nutritiva no ha de verse comprometida en demasía. La congelación (-18°C), en cambio, puede afectar negativamente al alimento sobre todo si no se hace en óptimas condiciones, ya que su textura puede perder jugosidad u otras propiedades. En cambio, la ultra congelación suele afectar mucho menos a los alimentos, sobre todo si la descongelación se hace en la forma adecuada.

- La formulación de ingredientes de origen natural (aceite, azúcar, sal, vinagre y alcohol), se ha venido haciendo desde tiempos inmemoriales para prolongar la vida útil de los alimentos y modificar sus propiedades sensoriales. Cada una de estas sustancias actúa de una forma distinta en el control del desarrollo microbiano; mientras que la sal y el azúcar disminuyen la actividad de agua, el aceite colabora en crear un ambiente anóxico, el vinagre acidifica el medio y el alcohol inhibe *per se* a los microorganismos. Más recientemente se han incorporado los aditivos, debidamente autorizados (antioxidantes, estabilizantes, espesantes, reguladores del pH, etc.), que pueden o no, modificar las propiedades organolépticas, algunos colaboran en la ralentización de la pérdida del valor nutritivo, mientras que otros ayudan activamente a prolongar la vida útil.
- Otro proceso muy antiguo es la desecación o deshidratación. La reducción de la humedad de los alimentos siempre conlleva un freno al desarrollo microbiano, pero éste solo será significativo cuando la actividad de agua del producto alcance unos valores medios (en torno a 0,9 y menos). La deshidratación, obviamente, afecta a la calidad sensorial de los productos, aunque se haga en las mejores condiciones.
- Una práctica muy poco establecida en España, pero que debería tener un halagüeño futuro es la irradiación, que surge como alternativa a la aplicación de agentes físicos como el calor. Es un proceso que inactiva a los microorganismos a dosis relativamente bajas (niveles de energía que se encuentran muy por debajo de lo que pueden inducir radioactividad), por lo que muchos alimentos pueden higienizarse, e incluso esterilizarse, sin que la calidad (sensorial y nutritiva) del producto sufra muchas modificaciones. En suma prolonga la vida útil en unas condiciones que, en bastantes casos, se acercan a las óptimas. Pese a esta indudable ventaja, siguen existiendo reticencias para irradiar alimentos, tanto en el ámbito científico como en el social. En la comunidad europea, la irradiación de alimentos está regulada por la Directiva 1999/3/CE del Parlamento Europeo y del Consejo del 22 de Febrero de 1999, que establece una lista de alimentos que suelen ser tratados con radiaciones ionizantes y los países en los que están permitidos. El Real Decreto Español 348/2001, del 4 de Abril del 2001, regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes, y limita su utilización a hierbas aromáticas secas, especies y condimentos vegetales, con una aplicación máxima de 10 kGy.

- En este último epígrafe se incluye un gran cajón de sastre donde caben las operaciones de conservación que se consideraron emergentes en su día, como la aplicación de altas presiones o el envasado en atmósferas modificadas, y las que todavía hoy están en estudio y aún se les aplica el término de emergentes con propiedad, como los pulsos de luz, los ultrasonidos, la manotermoultrasonificación, etc. Todas ellas son más o menos microbicidas y todas afectan en alguna “medida escasa” por regla general, a la calidad sensorial y nutritiva de los alimentos (Casp y Requena, 2003).

Para aplicar cualquiera de los procesos de conservación antes mencionados, es imprescindible conocer en profundidad las características de los alimentos, su carga microbiana más típica y la que pueda entrañar mayores peligros para el consumidor y que, claro está, debe eliminarse.

Como acaba de verse, la industria dispone en la actualidad de múltiples herramientas para conseguir los objetivos de seguridad alimentaria que se plantee y también dispone de los conocimientos imprescindibles para minimizar los daños químicos en sus productos para ofrecer al consumidor alimentos sanos, seguros, nutritivos y apetecibles a un precio competitivo. La confianza en la inocuidad e integridad de los alimentos, es un requisito crucial para la industria de los alimentos y para el consumidor (Cubero y col., 2002; Casp y Requena, 2003).

1.2.2 Compuestos químicos con propiedades antimicrobianas

La estabilidad microbiológica de la mayoría de los alimentos (tradicionales y nuevos) se consigue mediante la combinación de diversos factores (las barreras de Leistner) como un pH ácido, a_w reducida, temperaturas bajas, tratamientos inactivantes, etc. Todos estos factores, y otros muchos, pueden prevenir el desarrollo microbiano, retardando e incluso inactivando completamente a los microorganismos. La combinación de los factores suele tener efectos sinérgicos, lográndose una inhibición o una inactivación microbiana mayor de la que cabría esperar si solo se diera un efecto aditivo. Esta sinergia puede potenciarse aún más cuando se incorporan compuestos químicos o conservadores con propiedades antimicrobianas (Ordóñez y col., 1998).

A este respecto, la FDA (Food and Drug Administration) define a un conservador químico, como cualquier compuesto que al adicionarlo a un alimento tiende a prevenir o retardar su deterioro. Se incluyen sal común, azúcares, vinagres, especias y sustancias que se adicionan al alimento por exposición directa como humo de madera o químicos aplicados por sus propiedades insecticidas y herbicidas (FDA, 2000; Adams y Moss, 2008).

En realidad, el conjunto de conservadores químicos con capacidad antimicrobiana utilizados en la práctica no ha sufrido variaciones notables en los últimos lustros, porque no es fácil encontrar nuevos compuestos con mejores características de los ya permitidos y a un coste racional y competitivo. Entre los compuestos más usados en la industria alimentaria los hay de origen natural (Tabla 1) y de síntesis. En la actualidad se está investigando profusamente el potencial antimicrobiano de muchas plantas, sobre todo aromáticas, dada la demanda de los consumidores por “lo natural”. Idealmente, el efecto antimicrobiano debería conseguirse al incluir “la hierba” sin purificar, como un ingrediente más. Sin embargo, la mayoría de los principios activos se encuentran en cantidades demasiado pequeñas para ser efectivas si se pretende mantener el aroma original del alimento. Es obvio que si se añaden cantidades más elevadas afectará al sabor y al aroma. Por tanto, en muchas ocasiones se hace necesario el aislamiento, la purificación y la estabilización de las sustancias antimicrobianas antes de incorporarlas a los alimentos para que el efecto antimicrobiano tenga lugar sin que se modifiquen sus propiedades sensoriales. El costo de utilizar antimicrobianos naturales debe ser igual de bajo que el de los conservantes químicos (Adams y Moss, 2008).

Tabla 1.
Sistemas antimicrobianos naturales de uso alimentario.

Fuente	Sistema	Aplicaciones
Microbiana	Bacteriocinas	Inhibición de <i>L. monocytogenes</i> y de patógenos de alimentos en general
	Ácidos orgánicos	Inhibición de mohos y levaduras
	Antibióticos	Diversos efectos dependiendo del tipo de antibiótico y tipo de microorganismo
Animal	Lisozima	Inhibición de bacterias en queso
	Lactoferrina	Inhibición de <i>L. monocytogenes</i>
	Lactoperoxidasa	Preservación de leche y queso cotagge Inhibición de <i>L. monocytogenes in vitro</i> y en quesos frescos
Vegetal	Aceites esenciales de oregano y ajo	Actividad antimicrobiana
	Compuestos fenólicos	Inhibición de <i>Campylobacter</i> in vitro

Fuente: adaptada de Gould (1995).

La actividad antimicrobiana de las especies y plantas (Tabla 1) se atribuyen generalmente a compuestos fenólicos presentes en los extractos o aceites esenciales de las mismas. Al respecto investigaciones recientes indica que los compuestos fenólicos derivados de la uva son candidatos potenciales a ser utilizados como una alternativa en el control de *Campylobacter*, que es el principal patógeno bacteriano asociado a enfermedades transmitidos por alimentos, causadas generalmente por el consumo de carnes de las aves, y especialmente el pollo (Mingo y col., 2012). Nieto y col. (2013) han comprobado en hamburguesas de carne de cerdo que el aceite de orégano tiene un efecto antioxidante, mientras que el ajo era prooxidante. Teniendo en cuenta que la oxidación proteica tiene implicaciones tanto en la calidad sensorial como en la nutritiva, es evidente que la adición de aceites esenciales podría ser una alternativa para evitar el crecimiento microbiano, pero sería imprescindible analizar el efecto de los aceites esenciales en la posible oxidación de la carne.

Otro grupo de compuestos de carácter antimicrobiano son los ácidos orgánicos. A la mayoría de ellos se les reconoce como seguros y su utilización está regulada por las

autoridades competentes tanto a nivel europeo como extracomunitario. Sin embargo, la selección de un agente químico específico para un determinado alimento no es, a veces, una labor fácil, y en su elección deben considerarse muchos factores, como las propiedades físicas o químicas de los agentes antimicrobianos, la composición del alimento, el tipo de conservación, las características y número de microorganismos habituales en el alimento, el coste y la posible toxicidad del agente antimicrobiano. Por lo que respecta a su mecanismo de acción, como los antimicrobianos actúan contra dianas metabólicas específicas y debido a que el metabolismo es una red entrelazada, a menudo es difícil determinar con exactitud cuál es el mecanismo por el que inactivan a los microorganismos (Adams y Moss, 2008).

1.3 ALIMENTOS Y ÁCIDEZ

El uso de ácidos orgánicos en la industria alimentaria es bien conocido como conservador, actuando más eficazmente sobre las levaduras y bacterias y en menor grado sobre los hongos. Su efectividad aumenta al reducir el pH, ya que la molécula sin disociar es la activa. No obstante contribuye al gusto y al aroma, lo que puede ser un perjuicio, pero en ocasiones se aprovecha, por ejemplo en mayonesa, aderezos, salsas, pescados, carnes, etc.

La mayoría de los ácidos orgánicos, como el ácido acético, son débiles ya que no se encuentran totalmente disociados en solución acuosa. Para entender el comportamiento de los ácidos resulta útil definir los conceptos pH y pK_a .

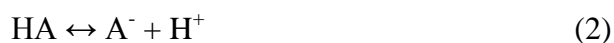
1.3.1 pH y pK_a

El pH es abreviatura de potencial hidrógeno; este término fue acuñado por el químico danés S.P.L. Sorensen (1868-1939), quién definió como el logaritmo negativo en base 10 de la actividad de los iones de hidrógeno.

$$\text{pH} = -\log_{10} [\text{H}^+] \quad (1)$$

Recuérdese para las próximas páginas la naturaleza logarítmica de la escala de pH, lo que implica que una disminución de 1 unidad equivale a un aumento de 10 la concentración de hidrogeniones.

El valor pK_a es el pH en el que establece un determinado equilibrio de disociación de una sustancia en solución. Sea HA un ácido cualquiera,



Aunque en realidad, el equilibrio de un ácido en solución acuosa es:



Los hidronios (H_3O^+) tienen el mismo significado práctico que los hidrogeniones, por lo que juegan el mismo papel en la determinación del pH y del pK_a , es decir el pH al que se establece un determinado equilibrio. La constante de disociación K_a del equilibrio (2) será:

$$K_a = [A^-] [H^+] / [HA] \quad (4)$$

Si despejamos $[H^+]$, queda:

$$[H^+] = [A^-] K_a / [HA] \quad (5)$$

Tomando logaritmos y cambiando el signo, queda:

$$-\log [H^+] = -\log K_a - \log ([HA] / [A^-]) \quad (6)$$

Y es así que el pK_a se define como el logaritmo decimal del inverso de la constante de disociación K_a del ácido; de esta manera este concepto nos proporciona una medida de la fuerza del ácido. De acuerdo con la ecuación de Henderson-Hasselbalch (1908 y 1916), a cada pH de la solución le corresponde una determinada proporción de ácido disociado de acuerdo con la siguiente ecuación:

$$pK_a = pH - \log ([A^-] / [AH]) \quad (7)$$

Esta última expresión nos indica que a un pH igual al pK_a la forma ionizada y no ionizada están a la misma concentración en equilibrio (Cubero y col., 2002; Rodríguez-Palenzuela, 2011).

1.3.2 Efecto del pH en el crecimiento de los microorganismos

Casi todas las bacterias crecen óptimamente a pHs en torno a la neutralidad, entre 6,5 y 7,5 y muy pocas crecen a pHs inferiores a 4. No obstante, unas cuantas bacterias, las acidófilas, como *Thiobacillus acidophilus* y *T. ferrooxidans*, y bastantes mohos y levaduras se multiplican a pHs bastante ácidos y, algunos, en un intervalo muy amplio, sobre todo los mohos, ya que ciertas especies se desarrollan en pHs superiores a 11 (Montville y Matthews, 2009). En la Figura 2 se muestra el intervalo de pHs que permiten el desarrollo de los microorganismos más relevantes en microbiología de los alimentos.

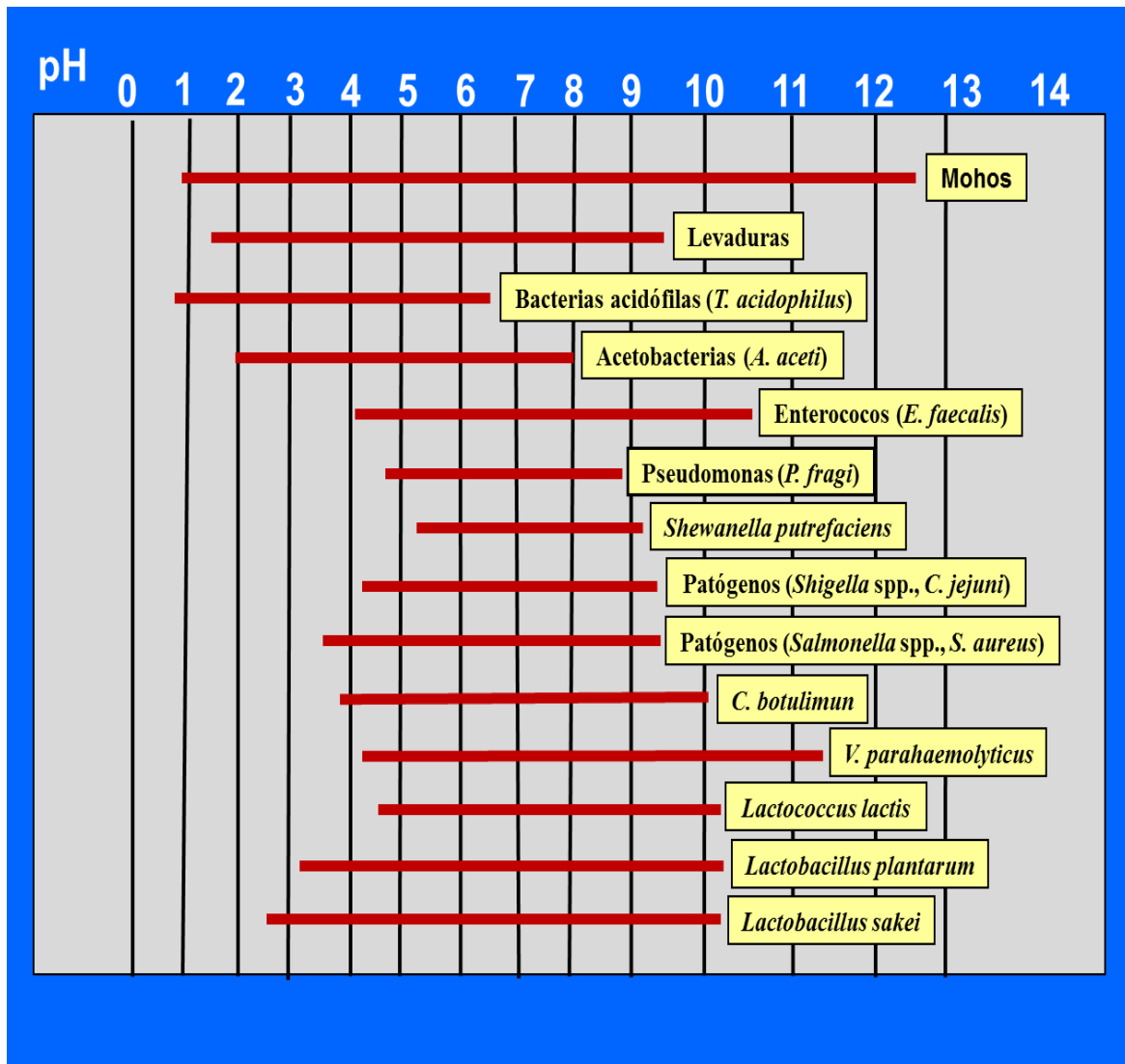


Figura 2. Intervalo de pHs que permiten el crecimiento de diversos microorganismos.

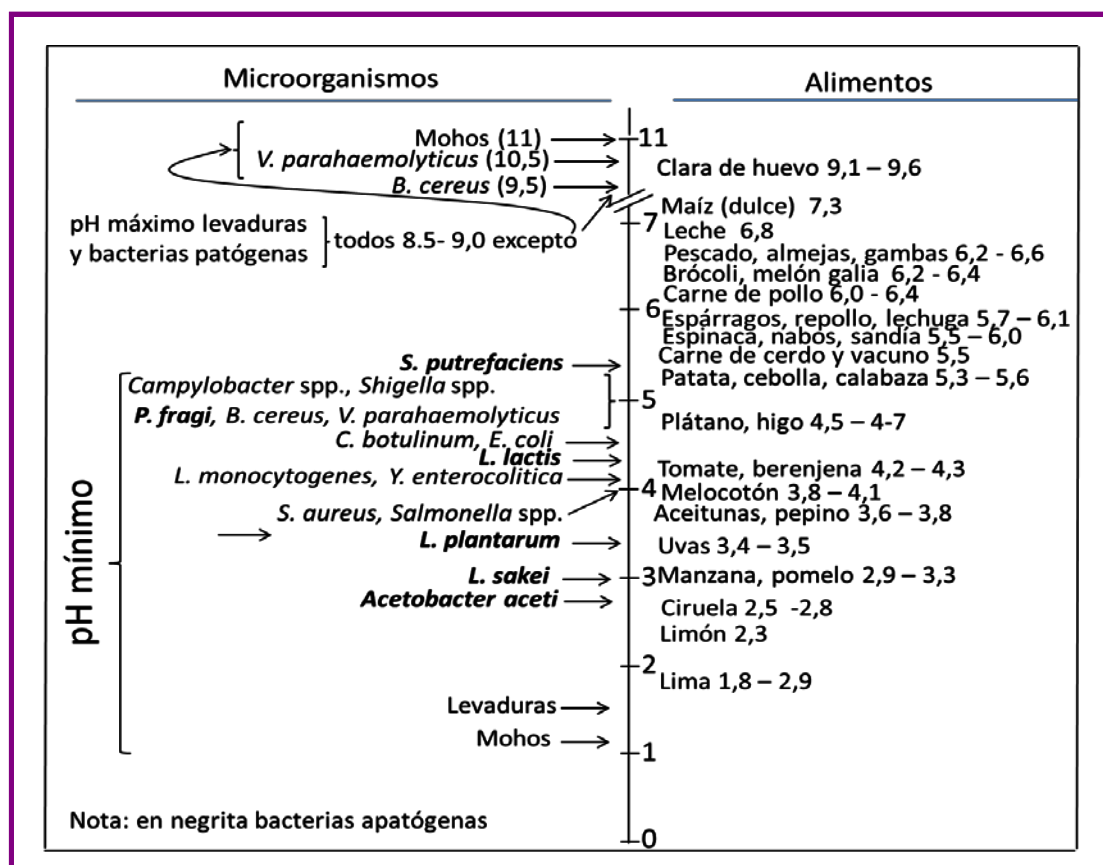
La respuesta homeostática mantiene la viabilidad celular ante pHs externos alejados del intracelular, modulando la actividad de la bomba de protones. Cuando se encuentra en un medio ácido, la célula tiene que impedir que los H^+ accedan a su interior o expulsarlos a la misma velocidad con que penetran; esto se logra merced a un mecanismo. La bomba de protones, que los microorganismos tienen ligado a la membrana y que consume energía. Si el consumo de esta es excesivo, la célula puede quedar completamente exhausta y perder su viabilidad (Davidson, 1997). Si la célula no logra mantener el pH estable no podrá sintetizar componentes celulares y se producirá una reducción en la actividad de los sistemas de transporte, limitándose la entrada de iones esenciales y nutrientes, por lo que será incapaz de dividirse y crecer o, al menos se reducirá la tasa de crecimiento o aumentará la fase de latencia (Cheroutre-Vialette y col., 1998).

Otra posibilidad es que el microorganismo intente neutralizar el pH del entorno. Cuando un microorganismo crece en un medio ácido, su metabolismo tiende a reducir la acidez que le circunda, es decir, aumenta el pH, mientras que ocurre lo contrario al desarrollarse en un medio alcalino. Por ejemplo, en medio ácido los aminoácido-decarboxilasas (pH óptimo de actividad alrededor de 4,0), incrementa el pH del entorno debido a las aminas que liberan. En cambio, cuando ciertos microorganismos crecen en un medio alcalino, sus desaminasas (pH óptimo de actividad en torno a 8,0) tienden a reducir el pH al liberar sustancias ácidas (Davidson, 1997; Cherouttre-Vialette y col., 1998).

La síntesis de una proteína de “choque” suele producirse a pHs bastante ácidos, del orden de 3 a 5, y su función es neutralizar los hidrogeniones.

1.3.3 El pH de los alimentos y su relación con los microorganismos

La mayor parte de los alimentos frescos (carnes, pescado y verduras) son ligeramente ácidos (pH 5,5-6,6), algunos tienen un pH bastante ácido (< 5,0), como la mayoría de las frutas, aunque los cítricos son más ácidos (pH en torno a 2,0-5,5), unos pocos otros están próximos a la neutralidad, como la leche (6,8) y alguna rareza, como la clara de huevo, tienen carácter alcalino (8,0-9,0). Obviamente, cuánto más bajo es el pH del alimento, es menos probable que las bacterias alterantes y patógenas puedan desarrollarse. Afortunadamente, los patógenos son bastante sensibles a la acidez y no son viables a pHs de 4,0. Ha de tenerse en cuenta que el pH no es constante, puede cambiar, y puede hacerlo de forma diferente en cada alimento, en función de las sustancias tampón que contenga, las condiciones de almacenamiento, entre otros factores. Por regla general, los productos de origen animal están más tamponados que las hortalizas. La Figura 3 muestra el pH de unos cuantos alimentos y los microorganismos más significativos que pueden desarrollarse en ellos (Cubero y col., 2002; Casp y Requena, 2003).



Fuente: Ordóñez y col. (2014)

Figura 3. pH de algunos alimentos y microorganismos más significativos que pueden multiplicarse en ellos.

En términos generales, las bacterias son más exigentes que los mohos y las levaduras en relación con el pH mínimo de crecimiento. La mayoría de las bacterias crecen óptimamente a un pH próximo a la neutralidad (desde 6,5 hasta 7,5) aunque también pueden hacerlo sin muchas dificultades en el intervalo 5-8; pero por debajo de 5,0 su crecimiento queda muy inhibido y raramente se multiplican a un pH de 4,5. Existen excepciones, como las bacterias acéticas, que tienen su pH óptimo entre 5,4 y 6,3 y su pH mínimo de crecimiento es de alrededor de 2,8 (Figura 2). Los mohos y las levaduras, en cambio, pueden multiplicarse de forma general a valores de pH menores que las bacterias, algunas especies incluso a un pH de 1,5-2,0, como *Zygosaccharomyces bailli* (Figura 2). Hay que decir que los pHs mínimos y máximos representados en la Figura 3 no deben considerarse como unos límites precisos, ya que dependen de otros factores que afectan al crecimiento microbiano (Cubero y col., 2002; Casp y Requena, 2003). Por ejemplo, se ha constatado que el pH mínimo de crecimiento de algunos lactobacilos depende del tipo de ácido que se utilice para la acidificación del medio. Los ácidos cítrico, clorhídrico, fosfórico y tartárico permiten el desarrollo a pHs

menores que los ácidos láctico y acético. En la zona alcalina, levaduras, mohos y bacterias cesan de multiplicarse a valores de pH similares, salvo excepciones, como algunas especies fúngicas en las que se ha observado crecimiento a valores máximos de alrededor de 11,0 y entre las bacterias, *Vibrio parahaemolyticus*, que puede crecer incluso a un pH de 10,5 (Figura 2) (Ordóñez y col., 2014).

Los principales agentes alterantes de los alimentos frescos de origen animal son las formas vegetativas de las bacterias psicrotrofas, siempre que el almacenamiento de tales productos se haga de acuerdo con la “lógica” temperatura de refrigeración. Estas bacterias y otras muchas crecen óptimamente en la neutralidad y cuanto más se aleje el pH del valor de 7, menos probabilidad de multiplicación y supervivencia tendrán los microorganismos, por lo que el pH es crítico para la alteración o “conservación” de muchos. En carne de pH normal (~5,5) predominan las bacterias aerobias Gram negativas, sobre todo las *Pseudomonas*; en cambio, un pH algo mayor (5,9-6,5), característico del pescado, marisco y carne de aves, permite el crecimiento de una bacteria, *Shewanella putrefaciens*, muy sensible al pH, ya que deja de crecer por debajo de pH 5,4. En alimentos más ácidos (pH < 4,5) las Gram negativas dejan de ser problemáticas y prevalecen las positivas, como los lactobacilos, que son particularmente resistentes a los ácidos débiles no disociados, como el láctico y el acético. Ya por debajo de un pH de 3,5, prácticamente sólo pueden desarrollarse mohos y levaduras (Ordóñez y col., 2014).

Por otra parte, la germinación de esporas bacterianas depende del pH. De hecho, este factor es crítico en los tratamientos térmicos esterilizantes, clasificándose los alimentos destinados a la fabricación de conservas en poco ácidos (pH > 4,5), ácidos (pH 4,5-4,0) y muy ácidos (pH < 4,0) dependiendo de que, por su pH, pueda germinar cualquier espora, no puedan germinar las de *Clostridium botulinum* y no pueda hacerlo ninguna espora, respectivamente (Casp y Requena, 2003).

Muchos microorganismos patógenos, como las *Shigella* spp. y *Campylobacter* spp., quedan inhibidos con pHs bajos (< 4,5) pero la inhibición de otros, como *E. coli* O157:H7 y alguna serovar de *Salmonella*, precisa de mayor acidez (Casp y Requena, 2003).

Debe tenerse presente que la combinación de la acidez con otras operaciones de conservación, como la refrigeración o una a_w reducida, pueden actuar de forma sinérgica. Por ejemplo, a medida que desciende la a_w , se necesita un pH menos ácido para inhibir el crecimiento de *Staphylococcus aureus* y la producción de sus enterotoxinas. Así mismo, la termorresistencia de los microorganismos disminuye a medida que el pH se desvía del óptimo de crecimiento, siendo el descenso mayor en la zona ácida (Ordóñez y col., 2014).

1.3.4 Actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos

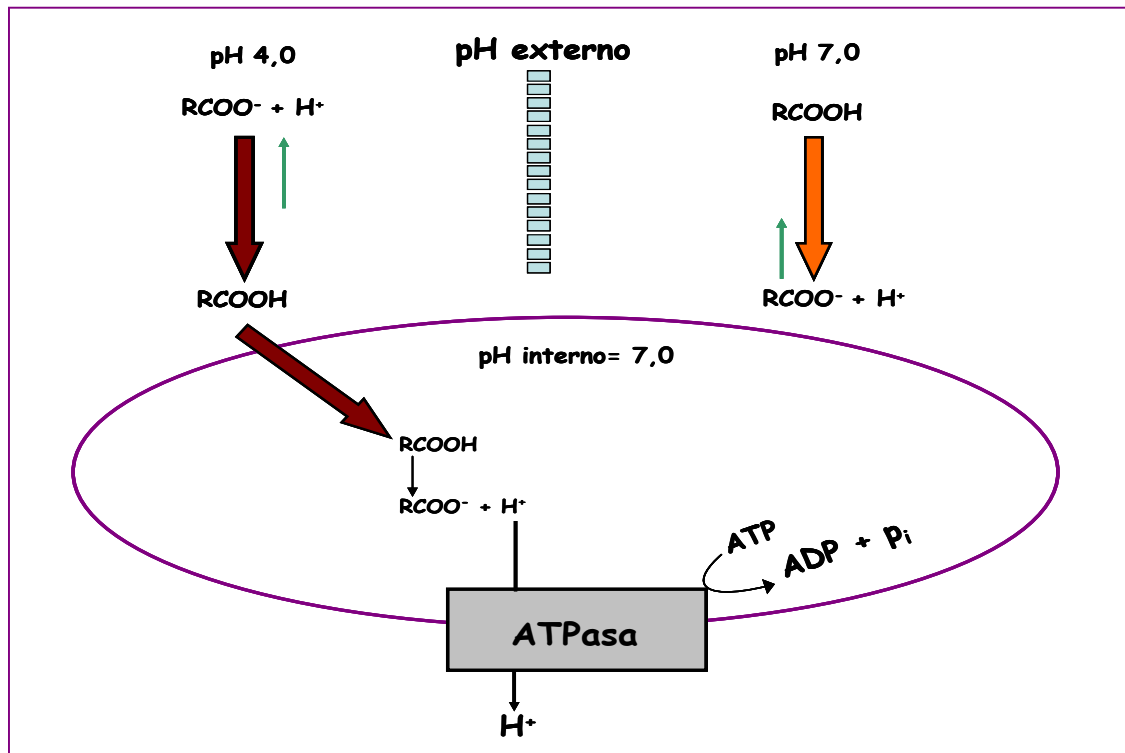
La actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos puede ejercerse desde tres frentes, por efecto de los iones hidrógeno libre, por el grado de disociación del ácido y debido a un efecto intrínseco a la naturaleza del ácido. No hay un acuerdo unánime de cuál de los tres efectos es más letal o dañino para los microorganismos, aunque suele aceptarse que el factor de mayor peso es el grado de disociación del ácido (Presser y col., 1997; Brul y Coote, 1999; Álvarez, 2009), que es función del pH como ya se ha visto en la ecuación de Henderson-Hasselbach (7). Como las células bacterianas suelen tener una carga superficial negativa, las sustancias no ionizadas pueden penetrar en ellas mientras que las ionizadas no pueden hacerlo. En condiciones de pH neutro o alcalino, los ácidos orgánicos están disociados, en forma de anión y su correspondiente protón, y no pueden acceder al citosol, mientras que, al no estar disociados en medio ácido, penetran y ejercen su efecto inactivante. La Tabla 2 muestra las proporciones de ácido no disociado en función del pH.

Tabla 2.
Proporciones de ácido no disociado a diferentes pHs.

Ácidos orgánicos	Valores de pH				
	3	4	5	6	7
Ácido acético	98,5	84,3	34,9	5,1	0,54
Ácido cítrico	93,5	59,3	12,8	1,4	0,14
Acido láctico	86,6	39,2	6,1	0,6	0,06

Fuente: Adaptada de García Pina (2011).

Valores expresados en %



Fuente: Adaptada de Montville y Matthews (2009)

Figura 4. Los ácidos orgánicos débiles son inhibidores efectivos únicamente a pH bajos, donde su forma protonada puede cruzar la membrana celular. Como el pH del citosol es más elevado que el externo, el ácido, al ingresar en él, se disocia y la célula tiene que utilizar energía para bombear los protones que acidifican el citoplasma hacia el exterior. A pH externos elevados, el ácido disociado no puede penetrar en la célula y por tanto no es efectivo.

Al acceder la forma no disociada de un compuesto ácido al citosol, como el pH de éste es prácticamente neutro, la sustancia se disocia, liberándose el anión y el protón (Salmond y col., 1984; Cherrington y col., 1991; Davidson, 1997, Álvarez, 2009). El aumento de la concentración de aniones modifica la osmolaridad y este cambio debe compensarse para que la célula se mantenga viable, con lo que se incrementan los niveles de Na^+ , K^+ y glutamato, lo que lleva a un incremento de la fuerza iónica intracelular) y a que la célula se hidrate y aumente su turgencia, lo que provoca un aumento de la presión mecánica sobre la pared del microorganismo, que, de persistir, puede hacer que la célula estalle (Foster, 2000; Álvarez, 2009). Por otra parte, los altos niveles de aniones citosólicos afectan a los procesos metabólicos al interferir en reacciones enzimáticas (Roe y col., 2002). Al disociarse el ácido en el interior de la célula, la acumulación de protones disminuye el pH intracelular (Fig. 4). La célula responde a esta acidificación intentando mantener el pH citoplasmático cercano a la neutralidad para conservar su funcionalidad fisiológica. Para ello, la célula ha de

eliminar el exceso de hidrogeniones, hecho que, por un lado, provoca la disipación de la fuerza motriz de protones y por otro un gasto de ATP, que puede causar el agotamiento de la energía celular (ICMSF, 1983; Gould y col., 1983; Davidson y Harrison, 2002). Si la célula no puede estabilizar su pH en torno a la neutralidad, verá reducida su actividad fisiológica “normal”, y dejará de multiplicarse o, al menos, verá cómo se prolonga su fase de latencia (Cherouttre-Vialette y col., 1998).

También se ha propuesto que los ácidos orgánicos afectan a la estructura y la actividad del ADN y de las proteínas de la membrana citoplasmática (Axe y Bailey, 1995; Stratford y Anslow, 1996; Davidson y Harrison, 2002). Además parece que interfieren en el transporte de sustancias nutritivas e influyen en la síntesis de macromoléculas (Denyer y Stewart., 1998; Alakomi y col., 2000; Davidson y Harrison, 2002).

No todos los ácidos son igualmente eficaces en la inhibición del crecimiento microbiano. Se ha observado, por ejemplo, que para disminuir la velocidad de crecimiento de *Staphylococcus aureus* en leche es necesario bajar el pH hasta 5'2, 4'9, 4'7 y 4'6 si se acidifica con ácido acético, láctico, cítrico y clorhídrico, respectivamente (Zurera-Cosano y col., 2004). Con *Salmonella* Typhimurium y *Clostridium botulinum* se han obtenido resultados parecidos (Davidson, 1997; Davidson y Harrison, 2002). En términos generales puede decirse que los ácidos fuertes, que generan un pH muy bajo porque están completamente disociados, no son muy permeables a través de la membrana, por lo que su acción deletérea se debe a que se desnaturalizan las enzimas de la superficie celular y a la entrada de protones al interior que provocará una bajada del pH interno. Por el contrario, los ácidos débiles, sobre todo los lipófilos, son más permeables y, como ya se ha mencionado anteriormente, bajan el pH interno; sin embargo, la porción no disociada de tales ácidos puede también ejercer efectos específicos en el metabolismo celular, lo que amplía sus acciones deletéreas. Por otra parte se ha comprobado que los ácidos orgánicos tienen más actividad antimicrobiana a medida que aumenta su peso molecular, aunque, en la práctica, los ácidos alifáticos de más de 10 carbonos no se utilizan por su escasa solubilidad en agua (ICMSF, 1983).

1.3.5 Factores que afectan a la actividad antimicrobiana de los ácidos orgánicos

En primer lugar, la composición del alimento y su estado pueden potenciar el efecto antimicrobiano o, por el contrario, proteger a los microorganismos. En los alimentos sólidos, los ácidos orgánicos suelen ser menos efectivos que en los líquidos, como consecuencia de la fijación de los microorganismos a las superficies que puede incrementar su resistencia al pH ácido (Krisch y Szajani, 1997). Si el producto es rico en grasa, los ácidos se acumulan en la fase oleosa, lo que limita su disponibilidad para inhibir a los microorganismos que se encuentran en la fase acuosa (Sofos y Busta, 1993). A considerar es la capacidad tampón del alimento (Lindsay, 2000) porque impide fluctuaciones de pH, lo que puede proteger a los microorganismos si el producto no acidifica o, al revés, colaborar en su inhibición porque no hay sustancias que puedan captar los hidrogeniones que se liberen y estos afecten directamente a los microorganismos. La actividad de agua del alimento influye en el pK_a de los ácidos orgánicos y por ello condiciona su efecto antimicrobiano (Pethybridge y col., 1983; Rouse y col., 1988).

En segundo lugar, la naturaleza del microorganismo que pretenda inhibirse. En líneas generales, las levaduras y los mohos toleran mejor la acidez que las bacterias y entre éstas, las Gram negativas suelen ser más resistentes que las Gram positivas (Russell, 1991), por tener la membrana externa que las protege (Nikaido y Vaara, 1985). Por otra parte, y como era de esperar, las células vegetativas son más sensibles que las esporas (Heinzel, 1998).

La resistencia microbiana frente a los agentes físicos y químicos está genéticamente codificada y no solo a nivel de especie, sino de serotipos. Así, se ha demostrado que la resistencia a la acidez de *Salmonella* spp. varía entre serovariedades (Arvizu-Medrano y Escartín, 2005) e, incluso, entre cepas del mismo serotipo (Bacon y col., 2003; de Jonge y col., 2003; Samelis y col., 2003; Berk y col., 2005; Yuk y Schneider, 2006).

Otro factor que no debe olvidarse es la temperatura de crecimiento. Samelis y col., (2003) han observado la resistencia ácida de *S. Typhimurium*, disminuye cuando crecía en temperaturas bajas en comparación con la resistencia desarrollada a temperaturas

más cercanas a la óptima. El mismo fenómeno se ha descrito para *Escherichia coli* (Cheng y Kaspar, 1998; Samelis y col., 2003). Este hecho, junto con la posibilidad de que se desarrollen tolerancias a la acidez, permite concluir la conveniencia de mantener los alimentos ácidos a temperaturas de refrigeración, aunque no hayan presentado antecedentes de desarrollo de toxiinfecciones.

La eficacia de los ácidos orgánicos está también relacionada con los niveles de contaminación inicial (Dickson, 1991; Greer y Dilts, 1992). Cuanto más abundante sea la microbiota inicial, más probabilidades existen de que se produzcan resistencias a la acidez (Lund y Eklund, 2000).

La fase de crecimiento en la que se encuentra un microorganismo condiciona su fisiología y su resistencia. Por regla general, las células en fase exponencial de desarrollo siempre son más sensibles, mientras que en fase estacionaria y de latencia presentan más resistencia a la acidez y a otros factores estresantes (Kolter y col., 1993). Debe tenerse en cuenta que los microorganismos expuestos a varias fuentes de estrés pueden desarrollar respuestas de protección cruzada, que se manifiestan en la adquisición de una mayor resistencia frente a otras condiciones adversas (Leyer y Johnson, 1992; Bearson y col., 1997; Duffy y col., 2000; Mazzotta, 2001). En realidad, la exposición de los microorganismos a un estrés previo y los posibles daños subletales que le haya podido causar pueden potenciar o minimizar su resistencia a la acidez (Davidson y Harrison, 2002). Este asunto se ha investigado en los últimos años, comprobándose que la exposición previa a un ácido orgánico puede inducir resistencia frente a una posterior acidificación (Leyer y Johnson, 1992; Garren y col., 1998; Buchanan y Edelson, 1999; Wilde y col., 2000; Mazzotta, 2001). Esta respuesta adaptativa conlleva una mayor probabilidad de supervivencia de los microorganismos tras una exposición a un pH que antes habría sido letal. Esta adaptación puede explicar que algún patógeno pueda sobrevivir a las condiciones extremadamente ácidas del estómago, mantenerse viables y provocar la enfermedad (Bodmer y col., 2000; Russell, 2001). El papel del pH del jugo gástrico como barrera frente a toxiinfecciones alimentarias es relevante; se ha comprobado que la dosis infectiva microbiana se reduce cuando los microorganismos se consumen con bicarbonato sódico o en los individuos con aclorhidria (Tamplin, 2005). Como colofón a estas líneas, debe apuntarse que son abundantes las investigaciones que correlacionan el desarrollo de tolerancia ácida con

virulencia (García-Portillo y col., 1993; Riesenber-Wilmes y col., 1996; Gahan y Hill, 1999). Lo que viene a resaltar la importancia de conocer el comportamiento microbiano ante condiciones de pH estresantes y poder relacionar tal conocimiento con la posibilidad de que un determinado producto ácido pudiera ser causa de toxiinfecciones alimentarias.

Es bien sabido que cada tipo de ácido orgánico va a tener un efecto microbicida determinado, pero también se ha comprobado que no todos los ácidos inducen el mismo grado de resistencia en los microorganismos expuestos a ellos. En este sentido, Greenacre y col. (2003) han observado que, tras exponer células de *S. Typhimurium* durante tiempos variables en TSB acidificado con ácido acético y láctico a pHs entre 5,0 y 5,8, el acético inducía más respuestas de tolerancia ácida. Así mismo, Yuk y Schneider (2006), comprobaron que el ácido málico inducía más tolerancias que el cítrico en varios serotipos de *Salmonella* (Agona, Gaminara, Michigan, Montevideo y Poona). Es decir, los derivados de la manzana podrían considerarse más proclives al desarrollo de tolerancias que los productos cítricos. Sin embargo, Arvizu-Medrano y Escartín (2005), apreciaron una similar inducción de resistencias a la acidez al exponer *S. Typhi* y *S. Typhimurium* a los ácidos cítrico, láctico y clorhídrico.

Al principio de este epígrafe ya se ha hecho un esbozo del efecto de la composición del alimento o del medio en el efecto microbicida de los ácidos orgánicos. Pero, además, el medio de tratamiento también influye en el desarrollo de tolerancias a la acidez. Así se ha comprobado que los alimentos ricos en grasas (mayonesas, chocolates) y proteínas (quesos) inducen un mayor grado de tolerancia microbiana. Por otra parte, algunos aminoácidos modifican la resistencia a la acidez (Waterman y Small, 1998). A este respecto, se ha observado que la inclusión en el medio de tratamiento de arginina, lisina y ácido glutámico mejora la supervivencia de *Escherichia coli* en condiciones ácidas (Castaine-Cornet y col., 1999; Castaine-Cornet y Foster, 2001; Iyer y col., 2003; Foster, 2004). En cambio, este efecto no se apreció tan nítidamente en especies de *Salmonella* (Park y col., 1996; de Jonge y col., 2003; Kieboom y Abee, 2006).

1.3.6 Utilización de ácidos orgánicos en la industria alimentaria

La mayor parte de los alimentos de origen animal y muchos vegetales tienen valores de pH entre 5,0 y 6,5 (Fig. 3), lo que les hace susceptibles de deterioro o de vehicular microorganismos patógenos, por lo que la acidificación, por sí sola o en combinación con otras tecnologías, constituye un método de conservación a tener en cuenta y que la industria aprovecha. Los ácidos más utilizados son los ácidos orgánicos (débiles) en detrimento de los fuertes, que prácticamente no tienen utilidad. Entre los más empleados cabe incluir a los ácidos acético, ascórbico, cítrico, láctico y málico. El *Codex Alimentarius* (2012) sólo reconoce como conservador al ácido acético, clasificando al resto como reguladores de la acidez (acético, cítrico, láctico y málico), antioxidantes (ascórbico y cítrico), emulsionantes (cítrico y málico) y agentes de retención del color (ascórbico). No obstante esta clasificación, no cabe duda de que todos ellos tienen poder microbicida.

El cloruro sódico (sal) y el ácido acético (vinagre) han sido los primeros aditivos alimentarios de la humanidad. El uso del ácido acético como conservante en alimentación es muy antiguo, de hecho una de las primeras noticias que se tiene del tradicional vinagre, provienen del oriente y datan del 5.000 antes de Cristo. En los tiempos de Babilonia se usaba como especia y como conservante. Hipócrates le atribuyó propiedades medicinales y se ha venido empleando como fármaco durante siglos. En la Antigua Roma se introdujo como bebida, diluido con agua, brebaje conocido como posca o *acetum cum aqua mixtum*; era una bebida típica del ejército romano que degustaba durante sus largas marchas (Aguilar, 2012). Es una sustancia cuyo sabor ácido es característico y resulta imprescindible en una gran variedad de alimentos y platos; es especialmente interesante en la elaboración de algunos productos grasos como mayonesa, mostaza, aderezos para ensaladas y otras salsas, pastas de tomate y ensaladas preparadas (García Pina, 2011).

El ácido acético se encuentra en forma natural en muchos alimentos. Puede obtenerse por una reacción de oxidación del acetaldehído o por fermentación controlada de las bacterias *Acetobacter* y *Acetomonas* al actuar sobre el etanol. Para conseguir esta fermentación pueden emplearse diversos sustratos, como zumos de manzana (vinagre de manzana), mostos de uva (vinagre de uva), vino (vinagre de vino), etc. Todos estos

tipos de vinagre coinciden en contener ácido acético, pero el resto de las sustancias aromáticas son muy diferentes en función del sustrato y por tanto el sabor será característico de cada uno y proporcionara diferencias sensoriales en el producto acabado (Cubero y col., 2002).

En el haber de su utilización caben su bajo coste y escasa toxicidad, mientras que en él destacan el intenso y, quizás desagradable, sabor que transmite a los alimentos (Hartwing y McDaniel, 1995) y el efecto agresivo que pudiera tener frente a ciertos materiales de envasado (Olafsson y col., 1993).

Dentro del Codex *Alimentarius* (2012) está identificado como E- 260. Se encuentra bajo el estatus GRAS reconocido como seguro, recomendando que el ácido acético para uso en alimentos debe ser de origen biológico (Grupo industrial AISA, 2009). Sobresaliendo por su característica de ser más bactericida que fungicida (Ingram y col., 1956).

El ácido ascórbico o vitamina C se encuentra en la mayoría de frutas y vegetales. Puede obtenerse por fermentación de la glucosa, seguida de una oxidación química. Se utiliza como antioxidante, sobre todo en productos cárnicos, para ralentizar o prevenir la formación de meta-mioglobina (Álvarez, 2009).

El ácido cítrico es un componente de multitud de frutas, encontrándose en grandes cantidades en cítricos, kiwis y fresas. Se obtiene mediante procesos fermentativos con levaduras. Su función más importante es como regulador de la acidez, aromatizante, para mejorar la gelificación de mermeladas y para retrasar el pardeamiento enzimático en frutas y derivados. Además, considerando su actividad antimicrobiana frente a mohos y bacterias, puede emplearse como conservante, encontrándose bastante extendido su uso por su agradable sabor, en comparación con el de los otros ácidos (Álvarez, 2009).

Aunque puede obtenerse por síntesis, casi todo el ácido láctico se obtiene por la acción de bacterias lácticas sobre algunos alimentos. Es un buen antimicrobiano con un amplio espectro de actividad; es efectivo frente a *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella* spp., *Bacillus* spp. y *Clostridium* spp (Álvarez, 2009). En la

industria alimentaria se utiliza con diversos fines, como acidificación y regulación del pH y potenciación del efecto de algunos antioxidantes como el ácido ascórbico. A todo ello hay que añadir su utilización como antimicrobiano en productos frescos o semiprosados, y para la descontaminación de canales en mataderos (Smulders y Greer, 1998; FDA, 2000; Fernández, 2007).

El ácido málico es un componente de la mayoría de frutas y vegetales, siendo muy abundante en las manzanas. En la industria alimentaria se usa habitualmente como acidulante en gaseosas, refrescos y productos a base de fruta (Álvarez, 2009).

Merece una mención especial la utilización de soluciones a base de ácidos orgánicos para la descontaminación de canales. Ha sido aprobada en Estados Unidos, Canadá y Australia, países en los que las canales se rocían con soluciones de ácido acético y láctico, logrando notorias reducciones del número de bacterias en la superficie de la canal (Dorsa y col., 1998; Smulders y Greer, 1998; Sofos y Smith, 1998). No obstante, esta práctica no está permitida en Europa por el momento (Smulders y Greer, 1998; Del Río y col., 2007). Entre los principales inconvenientes que el Comité Científico Consultivo Veterinario de la Unión Europea encontró para su aprobación destaca el efecto negativo que podría representar para la mentalidad del ganadero, aduciéndose que éste estaría tentado a rebajar el nivel de exigencia higiénica en la granja y se correrían unos riesgos similares en el resto de eslabones de la cadena de producción (Smulders y Greer, 1998). Por ello, el comité de expertos no recomendó la implantación de técnicas de descontaminación durante el procesado de productos cárnicos, aunque dejó la puerta abierta para la reconsideración de su decisión a la espera de nuevos indicios que la hagan aconsejable. Por otra parte, debe considerarse la probabilidad de que la utilización de soluciones de ácidos orgánicos para descontaminar canales redunde en respuestas bacterianas adaptativas que derivarían en un incremento de la resistencia microbiana a la acidez y otras condiciones estresantes (Samelis y col., 2002; Stopforth y col., 2003).

1.4 ALIMENTOS MÍNIMAMENTE PROCESADOS (AMP)

La industria alimentaria tiene un compromiso con la sociedad. Ha de ofrecer alimentos seguros, nutritivos, a un coste razonable y atractivos. Es obvio que el gusto y los hábitos del ser humano evolucionan. La sociedad considera obsoleta la dieta de hace unos años, aunque es posible que de nuevo se ponga de moda. El consumidor de la cultura occidental del principio del siglo XXI demanda alimentos seguros, nutritivos y “naturales”, sobrentendiendo en esta naturalidad la calidad sensorial y abarcando este término entrecomillado muchas, variadas y, a veces, contradictorias posibilidades. Además, esta naturalidad ha demonizado a los aditivos químicos. En suma, estos precedentes han conducido al desarrollo e implantación de los llamados productos o alimentos mínimamente procesados (AMP) (Martínez Toral, 2012). Dadas las características de la sociedad de hoy, este concepto de alimento no estaría completo si no se le une su comodidad de uso. Y este último requisito no ayuda a la calidad higiénica, como es fácil de comprender por el loncheado de productos cárnicos o de salmón ahumado, el troceado de lechugas, etc. Cualquier operación implica un incremento de los riesgos que el fabricante asume y, obviamente, si se toman en un sentido estricto la minimización del procesado, la reducción de conservantes y la comodidad de uso, cabe la posibilidad de que tales riesgos microbiológicos lleguen a ser demasiados.

La industria alimentaria ha tenido que adaptarse a estos hábitos y, además de producir los alimentos, llamémosles, clásicos, ha montado líneas para la elaboración de productos de consumo rápido, entre ellos platos precocinados, productos listos para cocinar y alimentos listos para calentar o, simplemente, listos para el consumo (Cabeza y col., 2012). Generalmente, estos dos últimos productos apenas sufren tratamientos previos al consumo y son susceptibles de sufrir contaminaciones cruzadas durante la fase de preparación (García y col., 2012).

¿Cómo definir un AMP? Un procesado mínimo podría definirse como el mínimo tratamiento que debe aplicarse para lograr un determinado objetivo (higiénico) y que influya mínimamente en la calidad (sensorial y nutritiva) del alimento. En términos de un tratamiento convencional, por ejemplo térmico, sería el par tiempo temperatura que “conserva” el alimento y, a la vez, retiene lo más posible su valor nutritivo y la calidad

sensorial. Los clásicos tratamientos UHT y HTST (High temperatura, Short Time, 72°C, 15 seg) son ejemplos que se acercan a esta idea ya que consiguen el mismo efecto microbicida que la esterilización hidrostática o la pasteurización LTLT (Low Temperature, Long Time) a unos 63°C durante 30 minutos, pero menoscaban menos la calidad del alimento tratado. No obstante, si se pretende una calidad todavía superior de la que ofrecen los procesos HTST o UHT, habría que pensar en reducir bien la temperatura de tratamiento, bien el tiempo de aplicación o ambos (Calderón-Miranda y col., 1999). Obviamente, esto implica asumir unos riesgos microbiológicos que hasta ahora no se asumían. Realmente, si la materia prima de la que se parte estuviera poco contaminada, podría ajustarse el tratamiento térmico a unas condiciones menos drásticas sin la asunción de mayores riesgos. La cuestión estribaría en garantizar que la materia prima mantuviera siempre una carga inicial por debajo de un máximo, al que se ajustaría el tratamiento térmico “mínimo”. Otra estrategia que pretende asumir menos riesgos, manteniendo unas calidades nutritivas y sensoriales elevadas radica en la combinación de varias operaciones de conservación en unas intensidades que por sí solas no garantizarían la higiene del alimento, pero al aplicarlas al unísono o consecutivamente, lo logran. Esta forma de entender la conservación integra diferentes métodos, aplicados de forma combinada sobre un alimento, modificando poco o muy poco sus atributos sensoriales y las características originales del producto fresco. Es en este contexto, no debe caber duda de que la acidificación -somera- es una herramienta a considerar. Tratamientos acidificantes que no garantizan la estabilidad microbiológica pueden combinarse con otras operaciones y actuar sinérgicamente en la inactivación de microorganismos manteniendo las características organolépticas de los alimentos o modificándolas ligeramente, incluso mejorándolas. Para profundizar en estos aspectos que se separan en cierta medida del núcleo de este tesis se recomienda al interesado la lectura del artículo de los profesores Raso y Barbosa-Cánovas, *nonthermal preservation of foods using combined processing techniques* (2003). En esta revisión se resalta el sinergismo existente entre las altas presiones y la acidificación y entre ésta y la aplicación de campos eléctricos pulsados.

La aplicación de tratamientos combinados, incluyendo la acidificación, puede resultar adecuada e incluso conveniente y recomendable para muchos alimentos, como sopas, cremas, gazpachos, salsas, pastas de tomate, encurtidos, escabeches, salazones, embutidos, etc.

1.5 MICROBIOLOGÍA PREDICTIVA

La microbiología predictiva se ha convertido en una herramienta, que permite evaluar, mediante modelos matemáticos las respuestas de los microorganismos (patógenos y alterantes) ante cualquier factor que pueda condicionar su supervivencia y crecimiento en un alimento (Aguirre, 2012). Los modelos matemáticos pueden predecir la concentración microbiana que existirá en el producto final a partir de ciertos datos como son la carga microbiana inicial y las condiciones imperantes (temperatura, pH, a_w , etc.) (Buchanan y Whiting, 1996). Este modelado y la predicción del comportamiento microbiano han conseguido que el conocimiento generado sea acumulativo, es decir, lo experimentado por un grupo de investigación o una industria le sirva a cualquier otro. En otras palabras, cualquiera puede aplicar un modelo desarrollado por otros siempre y cuando las condiciones de producción, almacenamiento, etc. del producto caigan dentro de los intervalos en los que se generó el modelo. Es decir, la aplicación de cualquier modelo implica la interpolación de las condiciones prácticas del producto en cuestión al modelo que predice el comportamiento microbiano (Baranyi y Roberts, 1995).

Los primeros pasos de la microbiología predictiva los dieron Esty y Meyer (1922), quienes describieron la inactivación térmica de esporas de *Clostridium botulinum* tipo A utilizando un modelo logarítmico lineal, el cual sigue utilizándose actualmente para calcular la cantidad de calor necesario en el procesamiento de alimentos enlatados de baja acidez. Este modelo sencillo indica que, a una temperatura dada, el grado de inactivación de una bacteria es constante en el tiempo, es decir, el porcentaje de población celular que se inactiva en una unidad de tiempo siempre es el mismo (Esty y Meyer, 1922). Después de un largo periodo sin publicaciones científicas que profundicen el conocimiento de la microbiología predictiva, su renacimiento se produjo entre las décadas de los 60 y 70, cuando los modelos se utilizaron para tratar problemas de deterioro de los alimentos (Spencer y Baines, 1964, Nixon, 1971; Olley y Ratkowsky, 1973a, b), seguido del uso de modelos de probabilidad para tratar toxiinfecciones (Roberts y col., 1981). Sin embargo, no fue hasta la década de los años 80 y una gran parte de los 90, cuando esta disciplina experimentó un gran impulso, debido al aumento de brotes de toxiinfecciones alimentarias, o mejor, al incremento del número de diagnóstico de tales brotes, junto al desarrollo tecnológico de ordenadores y

de paquetes estadísticos, que simplifican los tediosos y engorros cálculos necesarios para el desarrollo de un modelo predictivo (Aguirre, 2012).

Una de las primeras definiciones de microbiología predictiva la propuso McMeekin y col. (1993), describiéndola como una “Ciencia cuantitativa que permite evaluar objetivamente la respuesta microbiana a las condiciones del procesado, la distribución y el almacenamiento y sus efectos en la seguridad microbiológica y la calidad de los alimentos”. Posteriormente, Fratamico y col. (2005), la definieron como la “Ciencia que parte de la premisa, de que el comportamiento microbiano (crecimiento, supervivencia e inactivación) pueden cuantificarse y expresarse con ecuaciones matemáticas, que permiten predecir tal comportamiento en unas determinadas condiciones ambientales”.

En este contexto se publicó el Reglamento (CE) 2073/2005 sobre los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, en el que se reconoce, en su anexo II, el uso de los modelos microbiológicos predictivos como una herramienta útil para la gestión de la seguridad alimentaria. En el año 2011, la Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN) publicó las pautas para la aplicación de lo dispuesto en el anexo II del reglamento antes mencionado.

A pesar de todos los cambios o aportaciones que ha habido en la definición de la microbiología predictiva, existe un consenso en sus fundamentos:

- La reproducibilidad del comportamiento microbiano en los alimentos (crecimiento, supervivencia e inactivación). Este se refiere a la capacidad que tenga una prueba o experimento de ser reproducido o replicado, proporcionando unos resultados dentro de lo esperable.
- Un número limitado de factores ambientales o intrínsecos del alimento determinan las respuestas cinéticas de los microorganismos. La temperatura, a_w , pH, conservantes, etc., influirán en el comportamiento microbiano y determinan una respuesta concreta.
- Los modelos matemáticos que describen cuantitativamente el efecto combinado de los factores ambientales en el comportamiento microbiano pueden utilizarse para predecir, el crecimiento o la inactivación de los microorganismos. Tal información

puede ser crucial para la seguridad alimentaria y la estimación de la vida útil de los alimentos (Roberts y Jarvis, 1983; Aguirre, 2012).

1.5.1 MODELOS PREDICTIVOS

La microbiota que se desarrolla en un alimento es función de los microorganismos inicialmente presentes, de los procesos aplicados, de la naturaleza del alimento y de las condiciones de conservación. Los microorganismos necesitan condiciones adecuadas para desarrollarse. El pH, la cantidad de agua, la temperatura, y otros factores han de estar en unos intervalos compatibles con el desarrollo de los microorganismos. Asimismo, deberán estar disponibles los nutrientes necesarios para que la multiplicación sea posible. Todos estos parámetros y bastantes más determinan en qué medida los microorganismos podrán multiplicarse y por ello constituir la microbiota alterante (Roberts, 1994; García, 1995).

La conservación de los alimentos puede incidir sobre estos parámetros, provocando unas condiciones desfavorables para los microorganismos. El procesado suele perseguir la destrucción parcial o total de los microorganismos o, al menos, la inhibición de su desarrollo. Un fallo en el procesado puede dar lugar a la supervivencia de microorganismos potencialmente peligrosos y/o a la producción de sus toxinas (García, 1995). Desde hace algunos años se ha visto la necesidad de profundizar en el conocimiento de la interacción de los diferentes factores que afectan el crecimiento microbiano, de forma que fuese posible predecir el comportamiento de los microorganismos en ese alimento y por lo tanto su estabilidad y seguridad microbiológica (García, 1995; Roberts, 1994).

Si se desarrollasen modelos aplicables a amplias categorías de alimentos se reduciría la necesidad de análisis microbiológicos rutinarios en muchos productos y sería posible predecir rápidamente su seguridad y vida útil por medio de la computarización de una base de datos, con el correspondiente ahorro económico.

Un modelo es una representación matemática simplificada de una realidad compleja, que persigue, en primer lugar, reproducir el comportamiento histórico del sistema y, en segundo, poder simular el comportamiento que el sistema tendrá frente a

diversas hipótesis que puedan establecerse (cambios de los parámetros que lo condicionan) (Aguirre, 2012).

Modelar es la acción de construir un modelo, de encorsetar la realidad. Implica la relación entre dos figuras (no necesariamente encarnadas por personas únicas sino por equipos): el modelador (encargado de la especificación y desarrollo del modelo) y el experto en la realidad a modelar (conocedor del problema real). La mayoría de las veces, el desarrollo de un modelo puede involucrar a un equipo multidisciplinar (matemáticos, estadísticos, ingenieros, etc.), que aportan diferentes perspectivas y conocimientos en la representación de la realidad. Afortunadamente, los modelos microbianos no suelen necesitar de tan complejos equipos. Un modelo debe equilibrar la necesidad de contemplar todos los detalles con la factibilidad de encontrar técnicas de solución adecuadas. Un modelo es, en definitiva, una herramienta de ayuda para la toma de decisiones. Por esta razón, sus resultados deben ser comprensibles y útiles (Ramos y col., 2010).

1.5.1.1 Clasificación de los modelos microbiológicos predictivos

Han sido bastantes los autores que han propuesto distintas clasificaciones de los modelos predictivos, y aún no se ha llegado a un consenso para establecer un criterio único de clasificación (McDonald y Sun, 1999).

Básicamente los modelos más utilizados se clasifican en:

- Según el fundamento matemático: modelo empírico y el modelo mecanicista.
- Según su finalidad pueden dividirse en: modelos cinéticos (crecimiento e inactivación) y modelos de probabilidad.
- Según la clasificación, ya clásica, propuesta por Whiting y Buchanan (1993) en modelos primarios, secundarios y terciarios.

1.5.1.1.1 Modelos empíricos y mecanicistas

Los **modelos empíricos** se ajustan a una función matemática a partir de los datos obtenidos experimentalmente, basados en la experiencia y la observación de los hechos. Éstos son de interés en situaciones prácticas y simplemente describen los datos de crecimiento o inactivación bajo condiciones experimentales en forma de una conveniente -en ocasiones la más conveniente- relación matemática (Gibson y col., 1987). Se pueden mencionar, a modo de ejemplo, las funciones de Gompertz, modelos de raíz cuadrada y sus modificaciones, ecuaciones polinómicas, redes neuronales artificiales (Geeraed y col., 1998), así como las modificaciones empíricas de la ecuación de Arrhenius utilizadas por Davey (1989, 1991 y 1994) para describir la tasa de crecimiento (μ) y la fase de latencia en función de la temperatura, a_w y pH (Davey, 1991, 1994).

Los **modelos mecanicistas** parten de una base teórica biológica, consideran hechos y obligan al modelo a adaptarse a la realidad biológica mediante una determinada hipótesis. Por tanto, estos modelos predicen con mayor exactitud los hechos reales (Bazin y Prosser, 1992), aunque no se ajusten con tanta exactitud como los empíricos a los datos utilizados para la generación del modelo. Ya indicaron Baranyi y Roberts (1994) que los modelos mecanicistas se ajustan más a la realidad y la predicen mejor. La mayoría de investigadores están de acuerdo en que los modelos mecanicistas son inherentemente mejores que los modelos empíricos, por las razones citadas anteriormente (Zwietering y col., 1993; Van Impe y col., 1992). Sin embargo, y paradójicamente, siguen siendo más los ejemplos de modelos empíricos encontrados en la bibliografía. De todas formas también hay bastantes ejemplos de modelos mecanicistas en la literatura. Basta recordar los más clásicos como el de Johnson y Lewin (1946), que describe el crecimiento de bacterias a altas temperaturas, el de Hultin (1955), que relata la velocidad de catálisis enzimática a baja temperatura, Sharpe y DeMichiele (1977), quienes modelaron el crecimiento microbiano en función de la temperatura (Aguirre, 2012). Los de McMeekin y col. (1993) y los de Ross (1996) que predicen la tasa de crecimiento microbiano en función de la temperatura, entre otros.

1.5.1.1.2 Modelos cinéticos y probabilísticos

Los **modelos cinéticos** son aquellos en los que a cada punto de un conjunto de variables independientes le corresponde un único valor de la variable dependiente. Son especialmente útiles en los sistemas que evolucionan con el tiempo, como son los sistemas dinámicos (van Boekel, 1996). En ellos podemos conocer, una vez que se han adjudicado valores a los distintos parámetros que aparecen en el modelo, y el estado del sistema en cualquier momento. No obstante, estos modelos son laboriosos de construir puesto que requieren muchos datos de recuento microbiano (Baranyi y col., 1995; McClure y col., 1994). Aun así, los modelos cinéticos se han empleado para modelar los efectos de variables intrínsecas y extrínsecas, particularmente la temperatura, en el crecimiento microbiano (McMeekin y col., 1997), desde luego con mayor frecuencia que los probabilísticos.

Los **modelos probabilísticos** se refieren a procesos estocásticos y dan un resultado que contempla la variabilidad de un sistema y de sus componentes. La misma entrada puede proporcionar diferentes resultados. Es decir, a un punto determinado de un conjunto de variables independientes le corresponden varios valores, cada uno de ellos con una probabilidad asociada. La base que se establece para la modelización probabilística es la relación existente entre el crecimiento o inactivación de las células microbianas y las propiedades fisicoquímicas del ambiente (Ross y McMeekin, 1995) que condicionarán el comportamiento microbiano y las probabilidades de que acontezca un suceso. El cálculo de la probabilidad de crecimiento microbiano -o inactivación- puede ayudar al productor de alimentos a la hora de tomar decisiones acerca de la formulación, procesado, envasado y almacenamiento de un producto (Roberts, 1995).

Buchanan (1993) determinó, con estos modelos, la probabilidad de que *Cl. botulinum* sobreviviera en carne de vaca enlatada en determinadas condiciones, sin embargo, en casos así, la probabilidad varía con el tiempo y, por tanto, estos modelos probabilísticos suelen ser más bien una combinación entre un modelo cinético y uno probabilístico *in strictu sensu*.

En ocasiones, los dos tipos de modelos pueden ser necesarios para lograr un objetivo. Por ejemplo, Ratkowsky y Ross (1995) formularon la hipótesis de que debería usarse un modelo cinético para generar un modelo probabilístico que describiese el límite de crecimiento/no crecimiento. Para ello, propusieron un modelo logístico de regresión para determinar la probabilidad de crecimiento en diversas condiciones, incluyendo pH, temperatura y concentraciones de cloruro y nitrito sódicos. La unión de aproximaciones cinéticas y probabilísticas puede verse como una integración de la microbiología predictiva de modelos cinéticos y probabilísticos, y una unificación de la microbiología predictiva y de la teoría de obstáculos (Ratkowsky y Ross, 1995). Sin embargo, para otros autores, como Presser y col. (1998), las razones para la unión de los modelos cinéticos y probabilísticos no están claras.

1.5.1.1.3 Modelos primarios, secundarios y terciarios

Los **modelos primarios** son aquellos que describen como varía la cantidad de microorganismos en función del tiempo (crecimiento, supervivencia, inactivación). Incluyen las curvas de crecimiento y de supervivencia. Los modelos de crecimiento pueden desarrollarse a partir de unidades formadoras de colonias (ufc), biomasa, medidas de absorbancia, además de niveles de sustratos o de productos metabólicos (Geeraerd y col., 2004). Muchos de los modelos primarios desarrollados hasta ahora son modelos deterministas de población. En estos modelos, la evolución del número total de células de una población es descrita a través de un sencillo conjunto de parámetros (fase de latencia, velocidad de crecimiento específica y máxima densidad poblacional) (Swinnen y col., 2004), que, en realidad, definen claramente la curva de crecimiento de un microorganismo. Como ejemplos de modelos primarios pueden destacarse el modelo de Baranyi y Roberts (1994), que permite cuantificar la cinética de crecimiento microbiano y obtener, por ejemplo, la tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max}); el modelo modificado de la ecuación de Gompertz para el mismo fin (Zwietering y col., 1990), el modelo de número de masa (“masa-number”) de Hills y Wright (1994), en el cual se relaciona el crecimiento de la biomasa con el aumento del número de células viables, el modelo de poblaciones heterogéneas de McKellar (1997), en el cual se asume que el inóculo está distribuido en dos compartimentos, es decir, células en crecimiento y células que no están en crecimiento, el modelo trifásico de Buchanan y col., (1997a), en el que se describe la clásica curva de crecimiento en tres

fases (latencia, exponencial y estacionaria), el modelo discreto-continuo de McKellar y Knight (2000), una expansión del modelo de McKellar (1997), en el que se permite la transición del compartimento en el que no hay crecimiento de células, y el modelo continuo – discreto –continuo de McKellar (2001), que es una ampliación del anterior al añadirle una etapa previa de adaptación continua (Swinnen y col., 2004).

Los **modelos secundarios** caracterizan los parámetros de los **modelos primarios** (fase de latencia, tasa de crecimiento específica y densidad máxima de la población), con respecto a uno o más factores extrínsecos (temperatura, pH, actividad de agua, etc.). Permiten considerar cómo dos o más factores interactúan sobre el crecimiento microbiano (dos Santos, 2007). Dentro de esta categoría pueden mencionarse ejemplos tales como el modelo de Ratkowsky y col., (1982), que relaciona la raíz cuadrada de la tasa máxima específica de crecimiento en función de la temperatura, modelos de adaptación de la ecuación de Arrhenius (Davey, 1989; Huang y col., 2011), modelos con un enfoque polinomial (Gibson y col., 1988; Buchanan y Phillips, 1990), modelos de superficie de respuesta (McClure y col., 1993a, b; Zurera-Cosano y col., 2006), modelos probabilísticos (Horowitz y col., 2010) o modelos obtenidos con redes neuronales artificiales (García-Gimeno y col., 2005).

Modelos terciarios se obtienen por integración de los primarios y secundarios implementados mediante una herramienta informática (software) a nivel usuario. La potencia de los actuales ordenadores han hecho que estas herramientas sean cada vez más asequibles, ahorrando a los usuarios los tediosos cálculos matemáticos y el tiempo en ellos invertidos (McKellar y Lu, 2003). Actualmente hay disponibles varios paquetes informáticos de modelos microbianos, que varían en complejidad, desde una sencilla ecuación en una hoja de cálculo, a sistemas expertos o programas de simulación de estimación de riesgos. Los principales modelos terciarios se muestran en la Tabla 3.

Tabla 3.
Principales modelos terciarios utilizados en microbiología predictiva.

Nombre	Creador	Aplicación
Combase	Institute of Food Research (IFR, UK).	Modelos predictivos de crecimiento e inactivación, generados a partir de datos facilitados por cientos de investigadores.
Pathogen Modelling Program (PMP).	United States Department of Agriculture.	Software de libre acceso, describe, el crecimiento, supervivencia e inactivación. Además de la producción.
<i>Salmonella</i> Enteritidis Risk Assessment (SERA).	Agriculture Research Service (USDA-ARS, USA).	El programa SERA incorpora una red de evaluación de riesgos microbiológicos.
Sea food Spoilage and Safety Predictor (SSSP).	Danish Institute for Fisheries Research (DIFRES) y la Universidad Técnica de Dinamarca	Este programa predice la vida útil de productos de la pesca con respecto a un determinado microorganismo, considerando la temperatura de almacenamiento, ya sea ésta fija o fluctuante.
Food Spoilage Predictor (FSP).	Universidad de Tasmania	Estos modelos cuantifican el efecto de la temperatura en diversos alimentos (carne, pescado y productos lácteos) y predice el crecimiento de microorganismos alterantes. Además es capaz de relacionar la vida útil de un producto con su historial de temperaturas de almacenamiento.
Refrigeration Index Calculator		
Food Micro Model (FMM)	Ministry of Agriculture, Fisheries and Food (MAFF, UK).	Este programa predice la evolución de microorganismos patógenos implicados en enfermedades alimentarias, así como la de microorganismos causantes del deterioro de los alimentos.
MicroHibro 2.0 Beta	Grupo AGR-170 (HIBRO) Universidad de Córdoba (Córdoba, España)	Herramienta on-line de evaluación del riesgo microbiano en vegetales y productos cárnicos.

Fuente: Adaptada de Aguirre (2012).

Si bien se ha comprobado que las herramientas informáticas descritas en la Tabla 3 permiten tener una idea bastante acertada del comportamiento microbiano (Dalgaard y Jorgensen, 1998; Giffel y Zwietering, 1999), sus predicciones no deben utilizarse a la ligera, y deben considerarse una aproximación con cierto grado de incertidumbre (Aguirre, 2012). Una limitación estadística trascendente de la mayoría de

los actuales modelos primarios y secundarios es la estimación de la variación alrededor del valor calculado. En condiciones extremas para el crecimiento, la variabilidad entre réplicas se magnifica. Para evitarla, suelen transformarse las variables para homogeneizar la varianza y alcanzar un mejor ajuste de los modelos. Los logaritmos y las raíces cuadradas están con frecuencia más próximamente distribuidos que los mismos valores sin transformar (Rodríguez Pérez, 2003).

Son sin embargo, las limitaciones biológicas las más difíciles de controlar/predecir o inclusive incluir de forma satisfactoria dentro de un modelo; por ejemplo, la presencia de factores de inhibición adicionales en un alimento, que no se incluyan en el modelo, por lo requiere tomar precauciones a la hora de la interpretación de las predicciones. Así mismo, la posible competencia que pudiera darse entre ciertos microorganismos presentes en los alimentos, raramente se incluye como una variable a la hora de confeccionar un modelo predictivo (Aguirre, 2012).

Por otro lado se ha demostrado que la supervivencia y crecimiento de los microorganismos en los alimentos no depende tan solo de la composición química de estos últimos y de las condiciones de almacenamiento, sino también de su estructura (Wilson, 2000). En alimentos de composición homogénea o en líquidos, este factor es claramente despreciable (Vereecken y col., 1998). Sin embargo, en alimentos sólidos o de composición heterogénea, la evolución microbiana está determinada por su posición en el interior del alimento. Los efectos de la estructura de los alimentos en los modelos predictivos incluyen la distribución mecánica del agua (Hills y col., 1997), la redistribución química de los ácidos orgánicos y otros conservantes (Brocklehurst y Wilson, 2000), y factores físicos como la movilidad de los microorganismos (Wimpenny y col., 1995). El comportamiento que tengan los microorganismos en las distintas matrices depende también del tipo de cepa utilizada, ya que se han observado diferencias en los parámetros cinéticos, inclusive en cepas de un mismo microorganismo (Begot y col., 1997).

Algunos investigadores (Pin y Baranyi, 1998; Vereecken y Van Impe, 2002) han demostrado la importancia de incluir en los modelos la interacción de mezclas de cepas de microorganismos durante el crecimiento. Sin embargo, Malakar y col. (2003) quitó importancia a las interacciones microbianas, ya que comprobaron que

solo juegan un papel relevante cuando el tamaño de la población microbiana es alto (en el caso de las bacterias ácido-lácticas 10^8 ufc/ml). Además se ha observado que en los cócteles de cepas, la cepa que alcanza la fase estacionaria antes que las demás pase a ser la cepa predominante, y las demás detienen su crecimiento, efecto conocido como “Jameson effect” (FAO/WHO, 2004; Carrasco Jiménez, 2007).

1.5.2 MÉTODOS DE OBTENCIÓN DE DATOS

La obtención de datos debe basarse en la optimización del número de datos y del coste empleado en su obtención. En general, en el caso de los modelos de crecimiento/inactivación, es necesario recopilar datos durante todo el periodo de crecimiento/inactivación del microorganismo. Respecto a esto último, no se ha establecido con claridad el número adecuado de muestras necesarias para que los datos experimentales generen un modelo estadísticamente robusto. El adjetivo robusto se utiliza en los modelos predictivos para designar aquellos modelos construidos con una base estadística sólida, basada en una gran cantidad de evidencias (Valero 2006; Aguirre 2012). Sin embargo, en la literatura pueden encontrarse algunos ejemplos que pueden usarse como guía a la hora de establecer un número adecuado de réplicas. Así se ha observado que durante todo el periodo de crecimiento o inactivación de microorganismos, casi siempre se necesitan alrededor de cien curvas para que el modelo sea significativo (McDonald y Sun, 1999). Gibson y col. (1987) concluyeron que como mínimo se necesitan entre 10 y 15 puntos generados por curva de crecimiento/inactivación, estableciendo un óptimo de 20 puntos. Un número menor de 10 puntos por curva, hace que el ajuste no sea lo suficientemente representativo, aumentando la incertidumbre de los datos (Valero, 2006). Poschet y Van Impe (1999), establecieron que dicha incertidumbre aumenta cuando se recogen menos puntos, pero por encima de un cierto número de datos, la incertidumbre se estabiliza y no disminuye significativamente.

Otro factor que afectará a la robustez del modelo es la disposición de los puntos recogidos dentro del diseño experimental. Esto es crucial para que sea óptima la estimación de las variables dependientes a estimar. Por ejemplo, en algunos casos los valores recogidos deben estar espaciados en un mismo rango (por ejemplo, pHs de 7'0, 6'5, 6'0, 5'5 y 5'0) mientras que en otros es mejor que los datos se concentren en unos

determinados valores (pHs de 7'0, 6'0, 5'5, 5'2 y 5'0). En este último caso se concentran donde se espera que la variable dependiente (por ejemplo, la tasa máxima de crecimiento) cambie de forma significativa (Valero, 2006).

El número y la calidad de las observaciones hechas (datos) determinarán la exactitud de los parámetros estimados (Bratchell y col., 1989; Poschet y col., 2004). El número de datos y el o los métodos utilizados para su recolección, definidos en la etapa de diseño experimental, deberán generar datos que proporcionen una información cuantitativa del comportamiento microbiano en estudio. La elección del método dependerá de qué quiere estudiarse, el material del cual se dispone, el tiempo que quiera invertirse y los costes involucrados (Aguirre, 2012). Algunos de estos métodos se describen a continuación.

1.5.2.1 Método de recuento de células viables

El método estándar utilizado para monitorizar el crecimiento de una población bacteriana es el recuento total de células viables en placa. Esta técnica ha sido utilizada como referencia para monitorizar el crecimiento microbiano o para calcular el número de supervivientes a un determinado tratamiento microbicida. Este método suele implicar la dilución decimal de las muestras en un medio líquido y la posterior siembra de la diluciones pertinentes en un medio de cultivo con agar, bien general o bien específico, ya en superficie ya en profundidad (dos Santos, 2007; Aguirre, 2012). Teóricamente, cada microorganismo viable generará una colonia, tras la correspondiente incubación, por lo que se asume que cada una de ellas proviene de un único microorganismo, denominado unidad formadora de colonia (ufc) (Anderson y Calderón, 2000), aunque esto no sea siempre cierto, dadas las estructuras en cadenas, racimos, pares, tétradas, etc., que pueden adoptar muchos microorganismos. Además, los microorganismos móviles en su desplazamiento, pueden generar grandes colonias que abarcan varias ufc. Por otra parte si el número de viables es elevado, es muy probable que los microorganismos estén cerca unos de otros y al multiplicarse, compartan colonia y ésta provendrá en realidad de dos o más ufc. De ahí la obviedad de que este método requiera de unos límites de conteo, sobre todo en lo que refiere al límite máximo. En este sentido, la Food and Drug Administration (FDA) estipula como límites 25 y 250 colonias (FDA, 1984), mientras que otra tendencia clásica es que solo se consideren las

placas con recuentos entre 30 y 300 colonias. La razón de ser del límite mínimo radica en que un recuento muy bajo de una muestra muy diluida puede conllevar un considerable error, por lo que siempre que se tengan recuentos de una dilución menor dentro del intervalo recomendado, éste o estos serán certeros (Anderson y Calderón, 2000). Este método requiere tiempo, más o menos prolongado dependiendo de las características de los microorganismos y de las condiciones de incubación, sobre todo de la temperatura, pero siempre más de 24 horas para la obtención de datos (Aguirre, 2012).

1.5.2.2 Método de turbidimetría

La turbidimetría es un método indirecto para estudiar el crecimiento bacteriano a partir de las medidas de absorbancia o densidad óptica (DO), ya que los microorganismos, como partículas que son, no permiten el paso de luz por lo que generan turbidez; esto hace posible el seguimiento del crecimiento de la población bacteriana en tiempo real (Dalgaard y col., 1994; Begot y col., 1996; Presser y col., 1998).

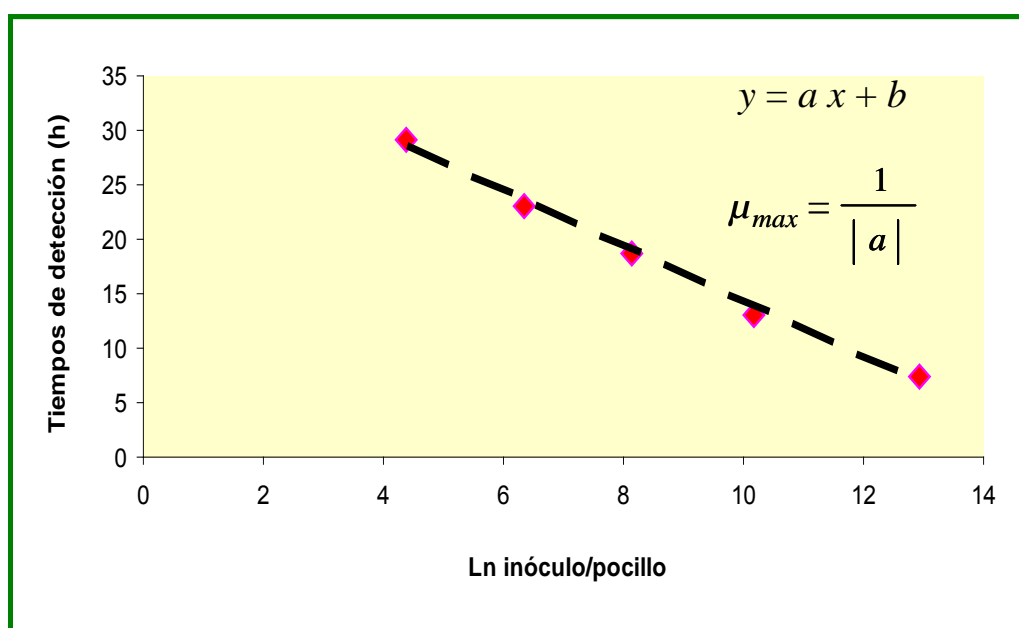
La densidad óptica está siendo utilizada desde hace muchos años para medir la concentración, expresada en masa o número de suspensiones bacterianas (Meynell y Meynell, 1970; McClure y col., 1993b). Esta técnica se basa en el hecho de que las células bacterianas suspendidas en un medio líquido transparente son capaces de absorber y dispersar un haz de luz incidente dependiendo de su concentración, tamaño y forma, índice de refracción y longitud de onda. El crecimiento bacteriano da lugar a un incremento de la turbidez de la suspensión (Valero, 2006). Esta proporcionalidad es la base del uso de la turbidimetría como un método rápido, no destructivo y relativamente económico para monitorizar el crecimiento de cultivos microbianos (Bajaj y col., 1991; Baumgart, 1992). Los resultados de esta técnica han ganado en precisión gracias a los relativamente nuevos equipos turbidimétricos automatizados existentes en el mercado, como es el ampliamente utilizado Bioscreen C (Labsytem, Finlandia) (McClure y col., 1993b), que permite realizar muchas medidas de DO de un cultivo en función del tiempo. No obstante, como inconveniente se describen una baja sensibilidad (la concentración celular detectable es de $10^6 - 10^7$ ufc/ml) y una relación no directamente proporcional entre las medidas de DO y los recuentos en placa cuando las densidades

celulares son elevadas (Valero, 2006; Aguirre, 2012). Posicionando esta concentración en una curva de crecimiento, se observa que el Bioscreen detecta el final de la fase exponencial de crecimiento por lo que las estimaciones que puede hacer de fases anteriores pueden ser erróneas (Swinnen y col., 2004). De todas formas es posible cuantificar los parámetros de crecimiento cuando el tamaño del inóculo está por debajo del umbral de detección. Para ello deben conocerse los recuentos celulares iniciales y la ecuación de calibración. Por ejemplo, Bréand y col. (1997) estimaron tiempos de latencia desde el punto de intersección entre la línea recta extrapolada con la pendiente igual a la velocidad de crecimiento (basada en las mediciones de DO detectables) en un punto del crecimiento visible y la línea horizontal en el logaritmo del recuento celular inicial (dos Santos, 2007).

Varios autores han descrito el método de calibración (Dalgaard y col., 1994; Chorin y col., 1997). McClure y col. (1993b) utilizaron una sencilla ecuación cuadrática para relacionar la densidad óptica con recuentos viables. Dalgaard y col. (1994) utilizaron dos métodos equivalentes de calibración: uno, en el cual las células de la fase estacionaria fueron diluidas a la DO apropiada y el otro, en la cual se tomaron medidas de DO y de recuentos viables durante el crecimiento. En algunos trabajos se ajusta directamente la ecuación de Gomperzt a datos turbidimétricos, aunque no se disponga de datos por debajo del mínimo de DO detectable (aprox. 10^7 ufc/ml), pero, evidentemente, deberán cuestionarse las estimaciones del tiempo de latencia y de la velocidad de crecimiento (Hudson, 1993; Hudson y Mott, 1994; dos Santos, 2007; Aguirre, 2012).

Otros autores (McKellar y Hawke, 2006; Aguirre y col., 2011) han propuesto el uso del tiempo de detección observado, es decir, el tiempo necesario para que una población celular alcance un nivel de turbidez detectable, como una alternativa fiable y factible para determinar la curva de crecimiento de un microorganismo. El tiempo de detección se define como el tiempo necesario para alcanzar una determinada absorbancia cuantificable y fiable, es decir, el tiempo necesario para que un determinado inóculo alcance una tasa microbiana que genere la suficiente turbidez para que el equipo de medida pueda detectarla. El método consiste, a grandes rasgos, en disponer de una serie de muestras con un inóculo conocido y sus diluciones seriadas. Obviamente, cuanto menor sea el inóculo, más tiempo tardarán las muestras que lo

contengan en alcanzar la absorbancia del nivel de detección y, viceversa, a mayor concentración del inóculo, menos tiempo. Con los datos del logaritmo natural de la concentración microbiana y el tiempo requerido por cada una de tales concentraciones en alcanzar el nivel de detección (T_d) se construye una gráfica y el inverso absoluto de la pendiente (a) de la recta de regresión coincide con la tasa máxima específica de crecimiento del microorganismo en las condiciones del experimento (Aguirre, 2012). La Figura 5 es un ejemplo que servirá para aclarar esta técnica.



Fuente: Adaptada de Aguirre (2012)

Figura 5. Representación del cálculo de la tasa máxima específica de crecimiento (μ_{max}) mediante los tiempos de detección de diferentes inóculos en el Bioscreen.

Francois y col (2005a) calcularon la fase de latencia de células individuales utilizando el Bioscreen, para ello midieron las absorbancias en la parte superior de la curva de crecimiento clásica y extrapolaron la pendiente de dicha recta hasta el punto de corte con la prolongación paralela al eje de abscisas de la concentración del inóculo (1 célula), similar a lo diseñado por Bréand y col (1997) (Swinnen y col., 2004) para calcular el tiempo de latencia de una población. Francois y col (2003) habían desarrollado previamente un protocolo consistente en diluir las muestras hasta obtener una única célula en los 300 μ l de medio que caben en cada pocillo del equipo. Con este sistema, los autores pretenden que el 80% de los pocillos del Bioscreen contengan una sola célula (Aguirre, 2012).

1.5.3 MÉTODOS PARA VALIDAR MODELOS PREDICTIVOS

Una vez obtenidos los datos del comportamiento microbiano con cualquiera de los métodos antes descritos, se aplica un modelo primario, adecuado al comportamiento de dichos datos, de tal forma que se exprese la evolución de las células en función del tiempo. Así se obtienen los parámetros cinéticos de los microorganismos para cada combinación de factores ambientales analizados. Más tarde es posible aplicar un modelo secundario para predecir cómo varían dichos parámetros en función de los cambios en uno o más factores ambientales. Finalmente, para comprobar la exactitud del modelo obtenido, se procederá a su validación para demostrar que el modelo predice con cierta certeza la realidad, puede aplicarse en la práctica de forma segura y, dentro de lo posible, puede integrarse en una herramienta informática como un modelo terciario (Aguirre, 2012).

Los ensayos de validación se pueden desarrollar en medios específicos, pero es mejor llevarlos a cabo en alimentos. El proceso de validación establece una comparación entre las variables dependientes estimadas por el modelo y los observados en los alimentos para un mismo microorganismo (Gibson y col., 1988; Sutherland y Bayliss, 1994). La validación de un modelo debe hacerse en alimentos, pero en muchos casos, debido al coste que implica, también se realiza sobre medios artificiales e incluso con datos procedentes de la literatura científica (Valero, 2006). Hay que considerar que la mayoría de los modelos predictivos se han desarrollado en medios de cultivos (Baranyi y col., 1999a), por ende no existen garantías de que los valores predichos por un modelo coincidan con los observados en un sistema alimenticio específico. Está comprobado que al complicarse más el sistema al que se aplica un modelo predictivo, aumenta el error de las predicciones (Pin y col., 1999).

La validez de un modelo desarrollado en el laboratorio y su aplicabilidad en alimentos debe cuestionarse, ya que estos son mucho más complejos en cuanto a composición, estructura macro y microscópica y por las operaciones por las que hayan podido pasar (tratamientos conservantes), además, estos factores pueden actuar, o no sinérgicamente. Es posible, por otra parte, que haya otros condicionantes, que se hayan pasado por alto en estas líneas o aún se desconozcan, que hagan a los alimentos un sustrato más adecuado para la validación de cualquier modelo. Por un lado se ha

demostrado que los alimentos reales pueden ser mejores sustratos para el crecimiento microbiano que los medios utilizados en un sistema modelo (Raevuori y Genigeorgis, 1975; Zhao y col., 2002) y, por otro, la carga inicial de un alimento y el estado fisiológico de los microorganismos que la forman pueden ser muy diferentes a los utilizados para la generación del modelo. Así, un producto sometido a pasteurización, con un pH algo ácido y una determinada concentración salina es posible que contenga un número pequeño de microorganismos viables, supervivientes al proceso y necesiten una fase de latencia prolongada para reparar sus daños adaptarse a las condiciones imperantes en el producto, mientras que, en el mismo alimento, una contaminación post-proceso, con microorganismos en plenitud de facultades, se caracterizan por un estado fisiológico muy diferente y unas capacidades distintas (Zhao y col., 2002).

La validación de los modelos predictivos se puede llevar acabo con datos obtenidos en las mismas condiciones que los utilizados para elaborar el modelo, denominada **validación interna**, con el fin de determinar si el modelo puede describir suficientemente los datos experimentales. Ejemplos de esto pueden encontrarse en los trabajos de García-Gimeno y col. (2002) y Zurera-Cosano y col. (2004).

La **validación externa** utiliza nuevos datos a partir de tests de inoculación en alimentos (challenge tests) (Whiting y Buchanan, 1994; te Giffel y Zwietering, 1999; Ross y col., 2000), o bien mediante la comparación con datos procedentes de la literatura científica (Fernández y col., 1997; McClure y col., 1997) para estimar la precisión de las predicciones hechas por el modelo. En esta validación se incluyen la validación matemática y de producto. La validación matemática cuantifica la seguridad matemática de un modelo comparando sus predicciones con nuevos datos experimentales. Estos nuevos datos, no usados para la generación del modelo, se habrán obtenido en condiciones experimentales similares, con el mismo sustrato, pero con diferente tamaño de inóculo, pH, temperatura, etc. Únicamente cuando la etapa previa de validación matemática demuestra la certidumbre del modelo será posible iniciar la validación de producto (Van Impe y col., 1999). Como ya se ha mencionado, ésta consiste en comparar las predicciones del modelo con observaciones en condiciones reales en un alimento. Con esta última validación se determina si las predicciones son lo suficientemente seguras y ciertas para aplicarse de forma rutinaria (Aguirre, 2012).

Para determinar qué predicciones proporcionan una buena descripción del crecimiento microbiano en los alimentos, los modelos deben validarse y evaluar su habilidad predictiva. Cuando un modelo se construye y valida adecuadamente, permite, por ejemplo, predecir el efecto del cambio de las condiciones de tratamiento sobre la evolución microbiana (Geeraerd y col., 2004). Un buen modelo debe ser generalista y no demasiado específico, a no ser que se requiera solo para una predicción muy específica. Esto significa que un modelo debería funcionar bien cuando se confronte con nuevos datos, siempre dentro de la región de interpolación del diseño experimental original (Aguirre, 2012).

En microbiología predictiva se han usado diversos métodos con el fin de comparar la bondad de ajuste de una serie de modelos a los datos utilizados para su elaboración, así como métodos para determinar la aceptabilidad de la predicción del modelo en relación al error inherente a los datos (Zwietering y col., 1994). A continuación se detallan algunos de estos indicadores.

1.5.3.1 Evaluación gráfica

Al representar los valores predichos respecto a los observados en una gráfica se ven de forma simple y rápida. Mediante esta representación, se puede apreciar fácilmente aquellas predicciones que podrían ser poco acertada, inseguras o peligrosas en la práctica y la bondad de ajuste del modelo (Valero, 2006). A este análisis visual, puede añadirse el análisis de los errores residuales, que da una idea de las diferencias entre los valores reales u observados y los predichos (Rodríguez Pérez, 2003). Más recomendable resulta la representación de la transformación logarítmica de los parámetros cinéticos porque el error de distribución será homogéneo, al quedar los puntos más equitativamente dispersos, aunque tiene el inconveniente de que las desviaciones y tendencias de los datos pueden pasar desapercibidas (te Giffel y Zwietering, 1999).

1.5.3.2 Análisis matemático

Si bien una mera evaluación gráfica es útil, es necesario un análisis matemático más profundo para valorar la fiabilidad o bondad de ajuste de un modelo primario, que

explica la evolución del comportamiento microbiano a lo largo del tiempo de análisis. Posteriormente, los parámetros obtenidos del modelo se relacionan con los factores considerados mediante un modelo secundario. El ajuste de las funciones puede emplear métodos de regresión lineal o no lineal dependiendo del tipo de modelo. La diferencia estriba en la forma de ajustar los datos y en las propiedades que tienen las estimaciones una vez ajustadas (McMeekin y col., 1993; Valero, 2006; Aguirre, 2012). A continuación se detallan algunos indicadores matemáticos.

1.5.3.2.1 Coeficiente de determinación (R^2)

Una vez ajustada una ecuación a la nube de puntos resultante de las observaciones, es importante disponer de una medida que calcule la bondad del ajuste realizado y que permita decidir si el ajuste es suficiente o se deben buscar modelos alternativos (Aguirre, 2012).

El coeficiente de determinación (R^2) es una medida adimensional, de fácil cálculo e interpretación, debido a su recorrido acotado entre cero y uno, lo que conduce a una profusa utilización de la misma (Martínez Rodríguez, 2005).

El R^2 da una idea del ajuste total conseguido, midiendo la fracción de la variación, alrededor de la media, que es explicada por el modelo, es decir mide la proporción de la variabilidad total de la variable dependiente respecto a su media que es explicada por el modelo de regresión. El valor más cercano a 1 significa una mejor predicción obtenida por ese modelo (Sutherland y Bayliss, 1994).

$$R^2 = \left[\frac{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})(Y_i - \bar{Y})}{\sqrt{\sum_{i=1}^n (X_i - \bar{X})^2 \sum_{i=1}^n (Y_i - \bar{Y})^2}} \right]^2 \quad (8)$$

Donde los subíndices i indican que son las observaciones hechas y se relacionan con las medias de tales observaciones y X e Y son las variables dependientes e independientes.

1.5.3.2.2 Raíz del error cuadrático medio (RMSE)

Este estadístico es una de las maneras de cuantificar el error cuadrático de las diferencias entre un valor predicho por un modelo y un valor real u observado (Aguirre, 2012).

Se calcula como la raíz cuadrada del sumatorio de las diferencias cuadradas de los valores predichos (X_i) y los valores observados (X_o) (diferencial residual) dividido por el número total de datos (n) (Sutherland y Bayliss, 1994; Aguirre, 2012). Es una medida de la variabilidad residual, no explicada por los cambios de los factores ambientales como concentración de cloruro sódico, pH o temperatura. Esta variabilidad residual puede deberse a varios motivos, incluyendo la variabilidad natural y ciertos errores sistemáticos (Sutherland y Bayliss, 1994).

$$RMSE = \sqrt{\frac{\sum (X_i - X_o)^2}{n}} \quad (9)$$

El valor más bajo de RMSE implica que el modelo predice con razonable certeza. Sin embargo, el RMSE de los datos observados puede ser grande y el modelo predice con exactitud, ya que depende mucho del orden de magnitud de los valores predichos y observados (Valero, 2006).

1.5.3.2.3 Factor de sesgo (Bias factor B_f) y factor de exactitud (Accuracy factor A_f)

Ross (1996) desarrolló dos índices para evaluar la bondad de ajuste de los modelos predictivos de forma sencilla. Estos índices, denominados factor de sesgo y factor de exactitud proporcionan una buena estimación de la fiabilidad de los modelos y se define como:

$$B_f = 10^{\left(\sum \log(X_{pred} / X_{obs})\right) / n} \quad (10)$$

$$A_f = 10^{\left(\sum |\log(X_{pred} / X_{obs})| / n\right)} \quad (11)$$

El objetivo de estos índices es estimar la bondad de ajuste de un modelo cuando se compara con observaciones que no se han utilizado para generarlo, pensando sobre todo en comparar las predicciones con datos obtenidos en alimentos. Estas comparaciones permiten evaluar la utilidad del modelo en la toma de decisiones en materia de seguridad alimentaria (Baranyi y col., 1999a). Desde el desarrollo de estos índices, su aplicación ha sido muy amplia en estudios de validación (Ross y col., 2000; Devlieghere y col., 2005).

Es importante recalcar que los usuarios de los modelos deben conocer su intervalo de aplicabilidad y los límites de su fiabilidad. Al considerar la bondad de ajuste de un modelo, hay que tener en cuenta si las predicciones que realiza son seguras o peligrosas, es decir, si sobreestiman o subestiman el crecimiento microbiano respectivamente. Aunque es preferible establecer un cierto margen de seguridad, conviene que los modelos se aproximen lo más posible a la realidad. Un $B_f > 1$ indica un modelo seguro para el caso de la tasa de crecimiento, porque el valor observado es inferior al estimado, lo que indica que el microorganismo crece más despacio en el alimento que en lo predicho, lo que da un margen de seguridad. En cambio un $B_f < 1$ para la fase de latencia indica que la predicción es segura porque la fase de latencia observada es mayor que la predicha por el modelo (Ross, 1996), es decir, la población tardará más tiempo del predicho en iniciar su multiplicación en el alimento. Cuanto mayor sea el valor del A_f , menos exacta es la predicción. Un valor de A_f de 1,7 indica que las predicciones, en promedio, difieren un 70% de las observaciones. Cuando ambos índices toman el valor de la unidad significa que existe concordancia perfecta entre los valores de los parámetros de crecimiento predichos y observados. Una buena concordancia entre los valores predichos, por ejemplo, de la tasa de crecimiento de un microorganismo y los observados en un alimento indica que el alimento por sí mismo juega un mínimo papel en la respuesta microbiana.

Idealmente, los modelos predictivos deberían tener un valor de $B_f = A_f = 1$, pero típicamente el valor de A_f aumentará en 0,10 a 0,15 por cada variable del modelo, siendo, por ejemplo, aceptable un modelo que predice el efecto de la temperatura, pH y la a_w sobre la tasa de crecimiento con valores de $A_f = 1,3 - 1,5$. No así para los valores que pueda tomar B_f , ya que definir un rango de éste, será relativo a la aplicación específica del modelo (Ross, 1996).

Cuando las predicciones difieren de los valores observados, las diferencias pueden deberse a infinidad de factores. Es posible que haya parámetros decisivos que no se han incluido en el modelo como antimicrobianos naturales del alimento, un determinado conservante añadido, el sistema de envasado, la estructura del alimento, etc. Si la respuesta observada difiere sustancialmente de la predicción es importante determinar la razón de esta diferencia y, quizás, sea necesario, incluir más variables independientes en el modelo para que su precisión mejore (Aguirre, 2012).

Baranyi y Pin (1999) introdujeron una modificación en los índices B_f y A_f descritos anteriormente, basándose en la diferencia del promedio de los valores cuadráticos. Dichos investigadores propusieron las siguientes ecuaciones para comparar un modelo f respecto de un modelo g :

$$B_{f,g} = \exp \left[\frac{\int_R (\ln f(x_1 \dots x_n) - \ln g(x_1 \dots x_n)) dx_1 \dots dx_n}{V(R)} \right] \quad (12)$$

$$A_{f,g} = \exp \left(\sqrt{\frac{\int_R (\ln f(x_1 \dots x_n) - \ln g(x_1 \dots x_n))^2 dx_1 \dots dx_n}{V(R)}} \right) \quad (13)$$

Donde $f(x_1 \dots x_n)$ son los valores predichos, por ejemplo, de la tasa máxima de crecimiento de la función f compuesta por n factores ambientales x ; $g(x_1 \dots x_n)$ son los valores predichos de la tasa máxima de crecimiento de la función g compuesta por n factores ambientales x y $V(R)$ es el volumen de la región $\int_R 1 dx_1 \dots dx_n$, es decir, si R está compuesto por el intervalo de temperatura $(T_1 - T_2)$ entonces $V(R) = T_2 - T_1$.

Las ecuaciones (12) y (13), se utilizan para comparar dos modelos, definidos como caso continuo, pero en casos discretos, donde n observaciones $g^{(1)}, g^{(2)}, \dots, g^{(n)}$ son hechas aleatoriamente en el entorno de la región R , entonces B_f y A_f estarán definidos por:

$$B_f = \exp \left(\frac{\sum_{k=1}^m (\ln f(x^{(k)}) - \ln g^{(k)})}{n} \right) \quad (14)$$

$$A_f = \exp \left(\sqrt{\frac{\sum_{k=1}^m (\ln f(x^{(k)}) - \ln g^{(k)})^2}{n}} \right) \quad (15)$$

Los mismos autores definieron además “porcentaje de discrepancia (% D_f)” y “porcentaje de sesgo (% B_f)”:

$$\% D_f = (A_f - 1) * 100 \quad (16)$$

$$\% B_f = \text{sgn}(\ln B_f) * (\exp|\ln B_f| - 1) * 100 \quad (17)$$

Donde **sgn** indica el signo de ($\ln B_f$), cuya función es indicar si el sesgo global es positivo o negativo. Si el % B_f es positivo, entonces, en promedio, las predicciones arrojan un valor mayor que las observaciones, en el caso por ejemplo de modelarse la tasa de crecimiento, el modelo predecirá un crecimiento más rápido que las observaciones, y el modelo se considera seguro.

El porcentaje de discrepancia no puede ser negativo, como mucho puede llegar a un valor nulo, si y solo si las predicciones son idénticas a las observaciones, y entonces el % B_f es cero también. No obstante, un % B_f muy pequeño, incluso de cero, puede darse aunque la precisión sea pobre, con un % D_f grande (Baranyi y Pin, 1999).

Por último, McClure y col. (1993a) introdujeron otra medida de la exactitud de las ecuaciones predictivas. Estos autores compararon sus modelos y la realidad mediante el sumatorio de los cuadrados de las diferencias entre los logaritmos naturales de los valores observados (g_{obs}) y los predichos (g_{pred}), siendo

$$\sum (\ln(g_{\text{obs}}) - \ln(g_{\text{pred}}))^2 \quad (18)$$

El modelo será más preciso cuanto más pequeño sea este valor.

1.5.4 APLICACIÓN DE LA MICROBIOLÓGIA PREDICTIVA

Aplicando un modelo predictivo puede obtenerse información de una manera rápida y eficaz del posible comportamiento que tendrá un microorganismo en ciertas condiciones ambientales (Aguirre, 2012). Es importante, sin embargo, tener en cuenta el hecho de que los modelos predictivos no sustituyen en ningún caso el análisis microbiológico rutinario que se lleva a cabo en una industria alimentaria (McDonald y Sun, 1999).

En los alimentos pueden actuar factores no contemplados en el modelo e influir de forma significativa en el comportamiento de un determinado microorganismo. El uso del modelo en estas situaciones no es apropiado ya que puede dar lugar a predicciones inexactas. No obstante, si el modelo se ha validado, es de suponer que aporte información rápida y útil que permita una toma de decisiones en muchas situaciones más o menos comprometidas. Así pues, los modelos predictivos son herramientas alternativas a considerar en la toma de decisiones en una industria alimentaria, que no siempre indican el camino correcto a seguir, aunque sí constituyen una guía bastante fiable (Valero, 2006).

Entre las aplicaciones de los modelos predictivos Valero (2006) cita por ejemplo el Análisis de Peligros y Puntos Críticos de Control (APPCC), Evaluación de Riesgos, Estudios de Vida Útil, Investigación y Desarrollo de un Producto, Medidas de Higiene e Integración de Temperatura (evaluación de las consecuencias de la temperatura de la cadena frío sobre la alteración microbiológica de un producto), Educación (de personal científico y no científico) y Diseño de Experimentos (definición de los intervalos entre cada factor a analizar).

1.5.5 CRECIMIENTO E INACTIVACIÓN

1.5.5.1 Crecimiento bacteriano

En microbiología, la palabra “crecimiento” se define como un incremento del número de células o de la masa celular por unidad de tiempo de una población

microbiana (Madigan y col., 1997). Si un microorganismo es cenocítico, es decir multinucleado, en el que las divisiones nucleares no se acompañan de divisiones celulares, el crecimiento produce un incremento de tamaño pero no del número de células. El crecimiento ocasiona un aumento del número de células cuando los microorganismos se multiplican por procesos de gemación o fisión binaria. En este caso, las células en un primer momento se agrandan y después se dividen para originar dos células hijas de un tamaño aproximadamente igual (Prescott y col., 1999).

La microbiología predictiva está relacionada con la compleja dinámica del comportamiento de la población microbiana, tal como apuntó Monod (1949). El crecimiento de los cultivos bacterianos, a pesar de la inmensa complejidad del fenómeno, generalmente obedece a leyes relativamente sencillas, las cuales hacen posible definir ciertas características cuantitativas del ciclo de crecimiento, esencialmente las tres constantes del crecimiento: crecimiento total, tasa de crecimiento exponencial y crecimiento latente. Estas etapas no son puramente arbitrarias y corresponden a elementos fisiológicamente distintos del ciclo de crecimiento (McMeekin y Ross, 2002).

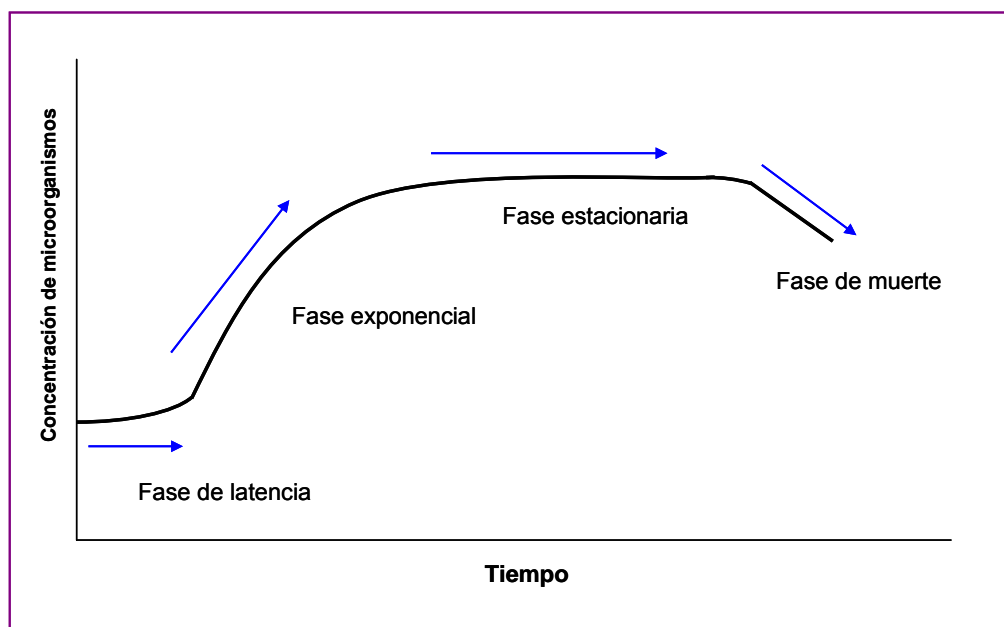


Figura 6. Curva de crecimiento microbiano

La curva de crecimiento de un cultivo microbiano puede ser subdividido en cuatro partes distintas denominadas: *fase de latencia*, *fase exponencial*, *fase estacionaria* y *fase de muerte* (Fig. 6).

La *fase de latencia*, es el período de ajuste que las células experimentan al acceder de un entorno a otro, antes de iniciar su crecimiento. La *fase exponencial* o logarítmica es aquella durante la cual los microorganismos se multiplican hasta el máximo nivel posible, en función de su potencial genético, tipo de medio y las condiciones en que crece. Se asume que en este período hay una relación lineal entre el logaritmo del número de células y el tiempo, aunque la realidad es la curva de crecimiento sigue un curso más bien sinusoidal. Los microorganismos se dividen y duplican su número en intervalos regulares. Como cada célula se divide en un momento ligeramente diferente del resto, la curva de crecimiento aumenta suavemente (Fig. 6), en lugar de crecer escalonadamente. La *fase estacionaria*, es el resultado del agotamiento de los nutrientes disponibles o del efecto de acumulación de productos tóxicos del metabolismo microbiano, que tienen como consecuencia la disminución de la velocidad de crecimiento. La transición entre la fase exponencial y la fase estacionaria se caracteriza por un crecimiento desequilibrado, durante el cual los diversos componentes celulares son sintetizados a diferentes velocidades. La *fase de muerte* es consecuencia de diversos factores, siendo uno de los más importantes el agotamiento de las reservas de energía de las células. Al igual que el crecimiento, la muerte también asume una función exponencial que puede representarse por una disminución lineal del número de las células viables a los largo del tiempo (Madigan y col., 1997; Prescott y col., 1999).

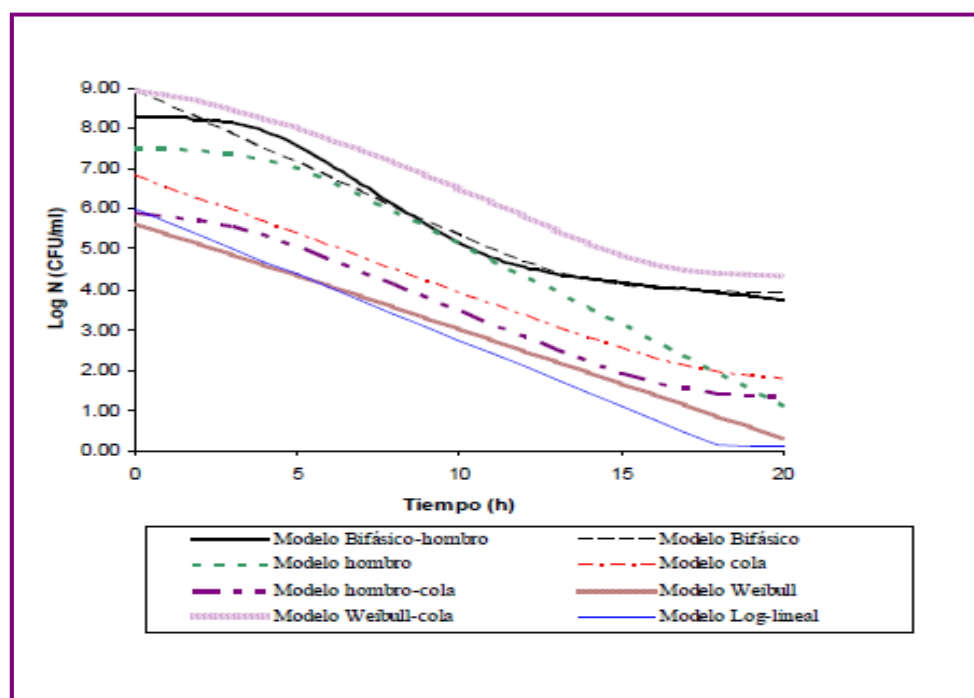
1.5.5.2 Inactivación microbiana

La inactivación microbiana puede definirse como la pérdida irreversible de la capacidad de reproducirse del microorganismo (Ryan y Ray, 2004). Sin embargo, la población bacteriana no se destruye instantáneamente cuando se ha expuesto a un agente letal; su muerte, al igual que su crecimiento es exponencial, es decir, a medida que la población va diezmándose, lo hace en iguales proporciones a intervalos constantes cuando sigue una cinética de primer orden (de ahí la linealidad de la representación del logaritmo de los supervivientes en relación al tiempo de tratamiento). No obstante, en ocasiones hay pérdida de la capacidad de multiplicación, pero el

microorganismo se mantiene viable, es decir, se trata de microorganismos viables no cultivables. En este estado no se observa un aumento del número de microorganismos, pero puede continuar desarrollando una actividad metabólica que se traduce, por ejemplo, en liberación de toxinas. Por otra parte hay que considerar que la capacidad de multiplicación de un microorganismo puede verse transitoriamente afectada por lesiones o por las condiciones físicas o químicas del entorno. En estos casos, podríamos considerarlos como microorganismos que podrán reanudar su crecimiento cuando las condiciones le sean de nuevo favorables (García, 1995).

El primer modelo desarrollado en el campo de la Microbiología Predictiva fue el de la inactivación térmica de *Clostridium botulinum* y los cálculos del valor D para este microorganismo, lo que redundó en una disminución de las letales intoxicaciones botulínicas. En la actualidad, el concepto de valor D_T es de general conocimiento y constituye uno de los parámetros cinéticos más representativos para estudiar la inhibición microbiana. Este valor D_T es fácilmente predecible a partir de tratamientos de inactivación lineales, es decir, cuando la disminución de la concentración microbiana en términos logarítmicos en función del tiempo es lineal. Sin embargo, su interpretación es más dificultosa en curvas o tratamientos de inactivación no lineales (Fig. 7). Aparte de la inactivación térmica, existen otras muchas operaciones que inactivan microorganismos, entre ellas la inactivación química, que es una de las áreas que están generando mayor interés en microbiología predictiva (Valero, 2006).

Los modelos de inactivación desarrollados hasta la fecha han sido fundamentalmente primarios, es decir, se limitan a describir la curva de inactivación. Son pocos los trabajos en los que se desarrollan modelos secundarios. Uno de ellos, es el realizado por Buchanan y col. (1997b), en el que se propone una ecuación polinomial para predecir la inactivación no-térmica de *Listeria monocytogenes* en función de la temperatura, pH, concentración de sal, nitrito sódico y concentración de ácido láctico (Valero, 2006).



Fuente: Adaptado de Valero (2006)

Figura 7. Representación gráfica de modelos no lineales de inactivación.

1.5.5.3 Fase de latencia

La latencia es un fenómeno inherente a la cinética microbiana. Está aceptado que esta fase viene a representar un tiempo de adaptación ante un cambio. La fase de latencia puede producirse en ambos procesos, tanto de crecimiento como de inactivación (Swinnen y col., 2004).

En el caso del crecimiento, la fase de latencia es el período de ajuste durante el cual las células bacterianas se modifican por sí mismas con el objetivo de sacar ventaja del nuevo ambiente e iniciar el crecimiento exponencial (Buchanan y Klawiter, 1991). Por tanto, durante la fase de latencia las células se adaptan a su nuevo entorno induciendo o reprimiendo la síntesis y actividad de determinadas enzimas, iniciando la replicación de su material genético, y en el caso de las esporas, diferenciándose en células vegetativas (Montville, 2000).

La relevancia de la fase de latencia desde un punto de vista práctico es enorme. Piénsese que cuando la fase de latencia es indefinida por el motivo que sea, no hay peligro de que los microorganismos se multipliquen y, entonces, la vida útil del

alimento, sería infinita desde un punto de vista exclusivamente microbiológico. El ejemplo más evidente de esta circunstancia sería un producto congelado. Considerando ahora el peligro que representa el desarrollo de patógenos, parece evidente que el conocimiento de la fase de latencia de tales microorganismos y su tasa de crecimiento en un producto son de enorme interés para poder ajustar con garantías sanitarias su vida útil. Esto implica que es necesario un gran conocimiento de la fase de latencia y de los factores fisiológicos que la afectan (McDonald y Sun, 1999).

Buchanan y Solberg definieron en 1972 la fase de latencia como el tiempo necesario para que la densidad de población se duplique. Y Pirt en 1975 definió el crecimiento latente como el periodo de transición durante el cual la tasa de crecimiento específico aumenta hasta al máximo valor característico de las condiciones de cultivo. No es fácil establecer una frontera entre la fase de latencia y la de crecimiento exponencial. A este respecto, y de acuerdo con Delignette-Muller (1998), esta frontera fue matemáticamente definida por Buchanan y Cygnarowicz (1990) como el instante cuando la segunda derivada del logaritmo de la concentración microbiana alcanza su máximo valor, es decir, el momento en el que el incremento de la tasa de crecimiento específico es máximo (máxima aceleración de la tasa de crecimiento). Hasta ese punto se prolongaría la fase de latencia, al menos en términos matemáticos para una población, y desde ese momento se iniciaría la fase exponencial (Swinnen y col., 2004).

Dado que la típica curva de crecimiento es de tipo sigmoideal, la duración de la fase de latencia puede ser cuantificada como el tiempo obtenido por la extrapolación de la tangente en la parte exponencial de la curva de crecimiento, hasta el nivel del inóculo (Swinnen y col., 2004).

Comúnmente, la fase de latencia que sigue a la inoculación del microorganismo en un medio de cultivo en el laboratorio (o de contaminación de un producto alimentario) en condiciones ambientales constantes puede definirse como la fase de latencia inicial. Sin embargo, variaciones ambientales durante este período de crecimiento pueden dar lugar a un crecimiento retardado, o latencia intermedia. Además del cambio del medio y del efecto de la dilución, la latencia inicial y la latencia intermedia pueden ser consideradas como esencialmente la misma, porque en ambos casos las células experimentan la transición de unas condiciones a otras (Swinnen y col.,

2004). Probablemente, y más que cualquier otro factor, la determinación precisa de la fase de latencia ha creado problemas a los microbiólogos predictivos. Incluso ha sido ignorada en muchas aplicaciones prácticas de modelos predictivos, como la evaluación de la higiene de las operaciones del procesamiento de la carne de Gill y col. (1991).

Hay diversos estados de latencia; no es igual la latencia de una célula sana que la de una dañada. La de la primera se considera una fase de latencia fisiológica y será más corta, para un mismo cambio de entorno o de condiciones, que la de las células que necesitan repararse. Por otra parte, también puede haber células incapaces de repararse, pero vivas y metabólicamente más o menos activas, las viables pero no cultivables, que pueden pasar desapercibidas en un momento determinado, pero que, quizás, si acceden a un entorno más favorable, podrían llegar a multiplicarse. Además, pueden surgir complicaciones de modelado cuando las fluctuaciones en las condiciones ambientales sean de la suficiente magnitud y rapidez como para inducir a una población que ya ha superado su fase de latencia para empezar otra vez uno de los estados latentes citados anteriormente (McMeekin y col., 2002).

La duración de la fase de latencia se ve afectada por factores como la identidad y el fenotipo de la bacteria (Buchanan y Cygnarowicz, 1990), el tamaño del inóculo (Baranyi y Roberts, 1994, Gnanou Besse y col., 2006), la historia fisiológica de la población (McMeekin y col., 1993), y por los cambios en el medio físico-químico, tales como la temperatura (Zwietering y col., 1994), el pH, la actividad de agua y la disponibilidad de nutrientes (Buchanan y Cygnarowicz, 1990). Augustin y col. (2000a), estudiando el crecimiento de *L. monocytogenes* en un medio pobre en nutrientes y bajo condiciones subóptimas, concluyeron que la fase de latencia se prolonga cuando el inóculo es estresado severamente por escasez de nutrientes y el tamaño del inóculo es muy pequeño.

Las predicciones del tiempo de latencia suele incurrir en errores. Esto se atribuye al efecto de la historia previa de las células, muy difícil de controlar. Robinson y col. (1998) formalizaron el concepto de tiempo de latencia dependiente de dos elementos:

- La cantidad de trabajo necesario por parte de las células para adaptarse al nuevo ambiente y/o reparar los daños que hayan podido sufrir las células.

- La proporción en la que estas reparaciones pueden hacerse.

Una pre-adaptación a condiciones alejadas de las óptimas de crecimiento puede reducir de manera espectacular los tiempos de latencia (Buchanan y Klawintter, 1991; Kroll y Patchetter, 1992; Hudson, 1993; Dufrenne y col., 1997). Incluso cuando se controlan todos los factores inherentes a las células que forman una población (inóculo), su número, su estado fisiológico, etc., todavía es difícil obtener una imagen clara de la forma cómo la latencia varía en función del ambiente externo (Robinson y col., 1998). Por tanto, la magnitud y el grado del cambio entre el ambiente anterior y el ambiente actual afectan el tiempo de latencia (dos Santos, 2007).

Whiting y Bagi (2002) examinaron la duración de la fase de latencia de células de *L. monocytogenes* crecidas en diferentes estados fisiológicos y transferidas a diferentes temperaturas: las células que crecían exponencialmente tuvieron fases de latencia más cortas; las células que estaban en la fase estacionaria y las células hambrientas tuvieron fases de latencia largas; las células refrigeradas tuvieron fase de latencia ligeramente largas y, las células desecadas exhibieron las fases de latencia más largas. Siguiendo estas mismas líneas investigativas, Augustin y col. (2000b) y Mellefont y col. (2000) concluyeron para *L. monocytogenes* y *E. coli*, respectivamente, que las células que crecían activamente se adaptaban más rápidamente a los cambios comparadas con los inóculos extraídos de las fases de latencia o estacionaria (dos Santos, 2007).

Parece obvio que, considerando la multitud de factores que influyen en la fase de latencia, su modelado sea extremadamente difícil, aunque también parece evidente que ese modelado es necesario para lograr una predicciones de la vida útil de un alimento que se aproximen a la realidad (Swinnen, 2004).

En esta Tesis se ha estudiado la fase de latencia de células individualizadas por lo que se considera que es el tiempo que transcurre desde que la célula accede a un nuevo entorno hasta que se divide en dos. En un sentido estricto, ese periodo de tiempo incluye el tiempo de adaptación y el de multiplicación, que comúnmente se denomina valor **g**.

1.5.5.4 Tiempo de generación

El tiempo de generación es el tiempo necesario para que se duplique una población bacteriana. Según Stanier y col (1989) se define como el tiempo requerido para que todos los componentes del cultivo aumenten en un factor de 2. Durante este periodo de generación el número de células y la masa celular se duplica. El tiempo de generación varía entre los distintos microorganismos. Muchas bacterias tienen tiempos de generación de 1-3 horas, conociéndose pocos microorganismos que crezcan muy rápidamente dividiéndose en menos de 10 minutos. Otras tienen tiempos de generación de varias horas o incluso días en condiciones más o menos cercanas a las óptimas. El tiempo de generación es útil como indicador del estado fisiológico de una población celular, y es usado con frecuencia para comprobar el efecto negativo o positivo de un determinado tratamiento sobre un cultivo bacteriano (Madigan y col., 1997).

El tiempo de generación está directamente relacionado con la velocidad de crecimiento exponencial, que se define como la pendiente de la curva de crecimiento microbiano en la fase de crecimiento exponencial. Generalmente, estos dos parámetros son estimados por el ajuste de los modelos primarios (Delignette-Muller, 1998), tales como la ecuación modificada de Gompertz (Gibson y col., 1988; Zwietering y col., 1990) o el modelo propuesto por Baranyi y Roberts (1994).

Varios autores han publicado que la fase de latencia es inversamente proporcional a la tasa específica de máximo crecimiento (Smith, 1985; McMeekin y col., 1993; Baranyi y Roberts, 1994; McMeekin y Ross, 2002). La relación proporcional entre el tiempo de latencia y el tiempo de generación es implícita o explícitamente asumida por algunos investigadores. Generalmente se admite que, a diferencia del tiempo de generación, el tiempo de latencia no depende solamente de las condiciones de crecimiento, sino que también de las condiciones de crecimiento previas, tal como se ha indicado anteriormente (Hudson, 1993; Dufrenne y col., 1997). Pero se supone que para los cultivos que tienen idénticos estados fisiológicos en el momento de la inoculación, pero se cultivaron bajo diferentes condiciones, el ratio del tiempo de latencia sobre el tiempo de generación es constante (Delignette-Muller, 1998).

1.5.5.5 Velocidad de crecimiento

Como ya se ha indicado anteriormente, el crecimiento se define como un incremento del número de células microbianas o de la masa microbiana en una población. Por tanto, la velocidad de crecimiento se define como el cambio en número de células o de la masa celular por unidad de tiempo (Madigan y col., 1999).

Un cultivo microbiano creciendo en equilibrio imita una reacción autocatalítica de primer orden, es decir, la velocidad del aumento de bacterias en un tiempo dado es proporcional al número o masa de bacterias presentes durante ese tiempo (Stainer y col., 1989).

La tasa del crecimiento exponencial (velocidad) de un microorganismo influyen dos conjuntos de factores: las condiciones ambientales (temperatura, pH, composición del medio), y las características genéticas del microorganismo (Madigan y col., 1997).

1.5.6 INFLUENCIA DE LOS FACTORES AMBIENTALES SOBRE EL CRECIMIENTO BACTERIANO

Los alimentos son ecosistemas complejos. Los ecosistemas están constituidos por el medio ambiente y los organismos que viven en él. El ambiente de un alimento está constituido por factores intrínsecos inherentes al alimento (por ejemplo, el pH, la actividad de agua y los nutrientes) y factores extrínsecos a él (por ejemplo, la temperatura, la composición del aire, o la presencia de otras bacterias) (Montville, 2000). Como el crecimiento bacteriano está influido notablemente por la naturaleza química y física de su ambiente, el conocimiento de tales influencias permite tener cierto control del crecimiento microbiano y estudiar la distribución ecológica de los microorganismos (Prescott y col., 1999). Los factores que afectan el crecimiento de los microorganismos en los alimentos no siempre actúan de la misma manera, pueden facilitarlo o perjudicarlo, pueden ralentizar o acelerar la velocidad de crecimiento y, a menudo, sus interacciones tienen efectos sinérgicos o antagónicos sobre el crecimiento. Estos efectos interactivos pueden ser muy importantes en los sistemas alimentarios, en los cuales el crecimiento bacteriano puede verse favorecido o inhibido por los muchos factores, como condiciones de almacenamiento o constituyentes alimentarios (Eifert y col., 1996).

Entre los varios factores ambientales que pueden tener influencia sobre el crecimiento bacteriano podemos destacar la temperatura y el pH. Las respuestas de las bacterias a estos factores de crecimiento son altamente reproducibles, por lo que son candidatos idóneos para su inclusión en modelos matemáticos (McMeekin y col., 1993; Krist y col., 1998).

No obstante, si se considera un alimento como un macroambiente, debemos tener en cuenta que también puede contener muchos microambientes distintos. Este hecho se puede ilustrar con la aparición de brotes de toxiinfecciones alimentarias por el consumo de alimentos con características típicamente aerobias causados por *Clostridium botulinum*, que es un anaerobio estricto. El crecimiento de *Clostridium botulinum* en patatas, cebollas y ensaladas de col expuestas al aire ha provocado brotes de botulismo (Lund, 1992). El oxígeno de estos alimentos se pierde durante el cocinado y difunde de nuevo más tarde al interior tan lentamente, que las partes centrales del producto permanecen anaerobias. El crecimiento de ciertos hongos y bacilos en la superficie de productos derivados del tomate puede generar gradientes de pH y oxígeno tales que permiten el crecimiento de *C.botulinum* y la producción de toxina en un área muy limitada del producto (Huhtanen y col., 1976; Montville, 1982). Éste es un buen ejemplo de cómo se encajan los ecosistemas unos con otros. Los microbios habitan microambientes situados en el macroambiente del alimento contenido en el ambiente humano (cuando una persona olvida refrigerar un producto), en un ambiente global (cuando el tiempo atmosférico puede proporcionar una temperatura que favorezca el crecimiento microbiano) (Montville, 2000).

1.5.6.1 Temperatura

El control de la temperatura se encuentra entre los factores más críticos (si no el más) para que el suministro alimentario reúna las propiedades sanitarias y organolépticas correctas. A este respecto, la ICMSF (1983) afirma que probablemente sea la temperatura el más importante. ¿Por qué es tan crucial la temperatura? Parece que su relevancia en el desarrollo microbiano radica en la sensibilidad de las reacciones catalizadas por enzimas a determinadas temperaturas. En condiciones de refrigeración, si la temperatura aumenta, se eleva la velocidad de crecimiento, porque la velocidad de una reacción catalizada por enzimas, como la de cualquier reacción química, casi se

duplicará por cada incremento de 10°C. Como la velocidad de cada reacción aumenta, el metabolismo en general es más activo a temperaturas altas, y el microorganismo crece más rápidamente. A partir de cierto punto, un mayor incremento de la temperatura disminuye la velocidad de crecimiento, y temperaturas lo suficientemente elevadas son letales. Las altas temperaturas ocasionan daños a los microorganismos al desnaturalizar las enzimas, las proteínas transportadoras y otras proteínas (Prescott y col., 1999; Montville, 2000).

Todos los microorganismos se caracterizan por una temperatura mínima por debajo de la cual no se produce un crecimiento o, lo que es similar, por encima de ella es posible el crecimiento, aunque sea muy lento, una temperatura óptima, en la cual el crecimiento es el más rápido, y una temperatura máxima por encima de la cual el crecimiento no es posible. Estas tres temperaturas son a menudo llamadas temperaturas cardinales, y son, generalmente, características de cada organismo, a pesar de que no son completamente fijas, ya que pueden ser modificadas por otros factores ambientales, particularmente la composición del medio de crecimiento (Madigan y col., 1997).

Durante el crecimiento en ambientes fríos son importantes muchas capacidades metabólicas. La adaptación homeoviscosa, permite a las células mantener la fluidez de sus membranas a bajas temperaturas. Conforme la temperatura disminuye, la célula sintetiza cantidades crecientes de ácidos grasos mono-insaturados y di-insaturados (Sinensky, 1974; Cossins y Sinensky, 1984) para que sus lípidos tengan una fluidez compatible con un metabolismo activo.

La temperatura de crecimiento también puede influir sobre la sensibilidad de la célula al calor. Las células de *Listeria monocytogenes* precultivadas a 48°C son más termorresistentes que las precultivadas a temperaturas menores (Montville, 2000),

1.5.6.2 pH

Cada especie tiene un intervalo definido de pH que le permite crecer y un pH óptimo para su desarrollo (Figura 2). Aunque los microorganismos crecen a menudo en medios en un amplio intervalo de pHs, su tolerancia tiene un límite. Variaciones intensas de pH pueden dañar a los microorganismos (en párrafos más arriba ya se

detallaron los efectos del pH a nivel de membrana plasmática) (Prescott y col., 1999). La mayoría de los ambientes naturales tienen valores de pH entre 5 y 9, la inmensa mayoría de los microorganismos crecen óptimamente dentro de estos valores, más en concreto entre pHs 6 y 8. A estos microorganismos se les considera neutrófilos. Pocas especies pueden crecer en medios con valores de pH inferiores a 2 (acidófilos, ejemplo Género *Thiobacillus*) o superiores a 10 (alcalinófilos, ejemplo Género *Vibrio*) (Madigan y col., 1997).

Los procesos de elaboración de alimentos que conllevan la liberación de ácidos orgánicos como, por ejemplo, la fermentación, se aprovechan como mecanismos de prevención del crecimiento microbiano en los alimentos y para garantizar la seguridad alimentaria, aparte de otras razones tecnológicas u organolépticas, etc. Es bien sabido que hay especies y cepas que son más resistentes o más sensibles a la acidez. Trabajos realizados en las dos últimas décadas han descrito la tolerancia de cepas de *E. coli* patógenas a pH bajos (Glass y col., 1992), la supervivencia en alimentos de pH bajo (Zhao y col., 1994), y la resistencia al efecto letal del pH muy bajo (Conner y Kotrola, 1995; Leyer y col., 1995) de este mismo microorganismo. Es evidente la importancia de comprender y ser capaz de predecir respuestas de los microorganismos al pH, y así determinar lo más correctamente posible los riesgos en diferentes alimentos y la serie de condiciones del medio necesarias para reducir o controlar su crecimiento (Presser y col., 1997).

A menudo los microorganismos tienen que adaptarse a cambios ambientales de pH para poder sobrevivir. En las bacterias, los sistemas de transporte de sodio y de potasio posiblemente corrigen pequeñas variaciones de pH. Si el pH se vuelve demasiado ácido, se ponen en marcha otros mecanismos como la ATPasa translocadora de proteínas que contribuyen a la respuesta protectora. Probablemente esta sustancia evite de alguna manera la desnaturalización de las proteínas y facilite de nuevo el plegamiento de las ya desnaturalizadas (Prescott y col., 1999).

1.5.6.3 Otros factores ambientales

A parte de la temperatura y del pH existen otros factores que influyen en el crecimiento microbiano. Entre ellos la actividad de agua (a_w), la concentración de oxígeno, la presión y la radiación.

La mayoría de los microorganismos, incluyendo las bacterias patógenas, crecen más rápidamente a niveles de actividad de agua de 0,995 – 0,980. La a_w de la mayoría de los medios de cultivo utilizados en el laboratorio es de 0,990 – 0,999. A valores de a_w inferiores a éstos, la velocidad de crecimiento y la concentración microbiana en la fase estacionaria o masa celular final disminuyen, y la fase de latencia aumenta. A una a_w suficientemente baja, que es difícil de definir con precisión, la fase de latencia se hace infinita, es decir, el crecimiento cesa (ICMSF, 1983).

Otro factor es la concentración de oxígeno. En función de la necesidad de su presencia o no para el crecimiento, los microorganismos se clasifican en aerobios y anaerobios, los que necesitan de oxígeno para su crecimiento y los que no pueden desarrollarse en su presencia. Existen algunas categorías intermedias, los anaerobios facultativos, que no necesitan oxígeno para crecer, pero que lo hacen mejor en su presencia, anaerobios aerotolerantes, los que crecen bien tanto en la presencia como en ausencia de oxígeno, y los microaerófilos, que precisan para su crecimiento niveles de oxígeno del orden del 2 al 10%, pero que son dañados por la concentración del oxígeno atmosférico (20%) (Madigan y col., 1999; Prescott y col., 1999).

Por lo que respecta a la presión, la mayoría de los microorganismos pasa la mayor parte de su ciclo vital sobre la “faz de la Tierra” o sobre la superficie del agua, siempre sometida a una presión de 1 atmósfera (atm), sin que esta les afecte de forma importante. Sin embargo, en las profundidades marinas (1.000 metros o más de profundidad) la presión hidrostática puede alcanzar de 600 a 1.100 atm y temperaturas de 2 a 3°C. A pesar de estos extremos, las bacterias pueden sobrevivir y adaptarse (dos Santos, 2007).

La radiación es también un factor que puede afectar el crecimiento microbiano. Nuestro ambiente está bombardeado por radiaciones electromagnéticas de

varios tipos. Muchas formas de radiación electromagnética son muy perjudiciales para los microorganismos. Esto es especialmente cierto en el caso de la radiación ionizante, de longitud de onda muy corta o de energía alta, que puede provocar que los átomos pierdan electrones, es decir, se ionicen. Niveles bajos de radiación ionizante producirán mutaciones y pueden causar indirectamente la muerte, mientras que niveles superiores son directamente letales. Aunque los microorganismos son más resistentes a la radiación ionizante que los organismos superiores, si las dosis son suficientemente elevadas, todos se inactivan. Los más radorresistentes son, entre las formas vegetativas, *Deinococcus radiodurans* y las endosporas bacterianas (Prescott y col, 1999).

Cabe citar que ante determinado estrés ambiental, los microorganismos quedan dañados sin que se produzca realmente la muerte de los mismos, debido a que dichos factores de estrés actúan en un grado subletal (calor, radiación, ácidos o los desinfectantes). Este daño se caracteriza por una disminución de la resistencia a agentes selectivos, o por un aumento en las necesidades nutritivas (ICMSF, 1980; Montville, 2000). El daño subletal es un proceso complejo y está influido por el tiempo de exposición, la temperatura, la concentración del agente estresante, la cepa objeto de estudio, la metodología experimental, etc. Este fenómeno de daño celular es muy importante en seguridad alimentaria (dos Santos, 2007) ya que puede impedir la multiplicación microbiana o, al menos, prolongar su inicio, ya que las bacterias dañadas necesitan de una reparación para alcanzar una capacidad fisiológica mínima para que puedan dividirse.

1.5.7 VARIABILIDAD E INCERTIDUMBRE

Los procesos microbiológicos son más variables de lo que muchos científicos se atreven a considerar. Hace décadas que se demostró que los tiempos de generación de células individuales en una población en crecimiento varían en un amplio rango (Kelly y Rahn, 1932). Más recientemente se ha observado que las células tratadas previamente pueden cambiar drásticamente la forma de la curva de supervivencia, por ejemplo para *L. monocytogenes* (Pagan y col., 1997). Incluso pequeñas diferencias en la matriz donde se encuentran los microorganismos pueden provocar cambios cruciales en la curva de supervivencia, ejemplo *Mycobacterium tuberculosis* muere en 15-20 min a 60°C en

leche, pero sobrevive a las mismas condiciones en nata (Hesse, 1960; Moureau y col., 1960).

Las células individuales difieren en sus cinéticas, pero cuando se habla de poblaciones, se suele trabajar con las cinéticas medias de todos los individuos que las forman. Cuando se inocula un determinado microorganismo en unas condiciones concretas, no existe una curva verdadera de crecimiento o supervivencia, existe un conjunto de datos que siguen una distribución de probabilidad. Los modelos predictivos que no incluyen la variabilidad en el sistema modelado únicamente proporcionan puntos estimados, como la media, y no son capaces de reproducir el rango completo de las posibles cinéticas (Shöne, 2011).

La variabilidad es un componente dependiente del sistema y no puede modificarse a menos que se cambie el sistema en sí mismo (Shöne, 2011), sin embargo puede modificarse y así tener un cierto control del sistema. Por ejemplo, el crecimiento microbiano en un alimento está condicionado por la variabilidad natural de la cepa y la propia del alimento. Si ambas “variables” pueden controlarse exhaustivamente, la variabilidad del desarrollo microbiano quedará más definida, aunque nunca se verá completamente anulada (Valero, 2006).

Sin embargo, la variabilidad lleva asociada un componente de incertidumbre (error en la estimación), que se define como el rango de valores que toma cada factor, que pueden ser potencialmente ciertos, pudiendo ser reducida, por ejemplo aumentando el número de repeticiones (Vose, 2008). La incertidumbre suele estar generada por errores experimentales o de ciertos aparatos; en realidad es una medida de la falta de conocimiento (es en sí, un medidor de ignorancia) sobre los parámetros que caracterizan un sistema (Aguirre, 2012).

Sir David Cox caracterizó la variabilidad y la incertidumbre como la “variabilidad es un fenómeno en el mundo físico, que puede medirse, analizarse y explicarse adecuadamente; en contraste, la incertidumbre es un aspecto del conocimiento” (Vose, 2008). La variabilidad dentro de una especie microbiana puede deberse a una variabilidad de cepa (Lianou y col., 2006) y/o la variabilidad celular intrínseca, es decir, como cada célula responde a las condiciones medioambientales (Nauta, 2000). Esta

variabilidad intrínseca puede ser un reflejo del estado fisiológico de la célula, el cual es o ha sido afectado por el medio ambiente del que procede, y de las condiciones de estrés por las que ha pasado (Robinson y col., 2001). La realidad es que una población microbiana, al igual que cualquier otra población de seres vivos, se compone de individuos más resistentes y de otros más sensibles; esta heterogeneidad puede deberse al genotipo (Noma y col., 2006), o en el caso de los clones, a diferencias no genotípicas (Booth, 2002; Humpheson y col., 1998).

Es necesario destacar, que en el contexto de esta tesis, nos referiremos a variabilidad únicamente en términos biológicos, relativos a la variación de la respuesta microbiana de individuos pertenecientes a una población y, supuestamente, clónicos.

En la evaluación cuantitativa de riesgos microbiológicos (QMRA, del inglés Quantitative microbial risk assessment), se debe tener en cuenta la variabilidad y la incertidumbre en términos del entorno del alimento y de la respuesta microbiana a ese entorno. Es útil mantener variabilidad e incertidumbre claramente separadas porque, de otro modo, no podrían determinarse. Recuérdese que la incertidumbre está condicionada por el número de datos de los que se dispone; si se tienen más, la incertidumbre suele reducirse, mientras que la variabilidad no disminuirá (Aguirre, 2012). Ambos conceptos, variabilidad e incertidumbre, pueden representarse con distribuciones de probabilidad que proporcionan una estructura matemática por propagación durante los cálculos (Ghanem y Red-Horse, 1999) y de esta manera pueden incluirse en los modelos matemáticos predictivos del desarrollo microbiano. Existen dos maneras distintas de incluir la variabilidad y la incertidumbre en los modelos predictivos. En una, los parámetros de un modelo determinista pueden reemplazarse por distribuciones de probabilidad. Esta aproximación de imponer estructuras probabilistas en los parámetros del modelo, por ejemplo en modelos de las tasas de crecimiento/muerte, conduce a la creación de modelos probabilísticos. La otra alternativa es estocástica, es decir aleatoria. La diferencia entre las dos es que la probabilística asocia una determinada probabilidad a cada dato, mientras que la estocástica solo predice el dato en sí mismo (Shöne, 2011). Por ejemplo, la fase de latencia de un microorganismo en unas determinadas condiciones fluctúa entre 1 y 5 horas. El modelo estocástico no va más allá de esa predicción. En cambio, el probabilístico asocia una frecuencia a cada posible fase de latencia entre 1 y 5 horas (Aguirre, 2012).

Una respuesta variable del microorganismo suele ser más notoria cuando las condiciones de crecimiento distan mucho de las óptimas o cuando se ha sometido a la población a operaciones que conllevan destrucción o estrés, como las utilizadas en cualquier proceso de conservación de alimentos. Así, por ejemplo, se ha observado un incremento en la variabilidad de la fase de latencia de células individuales tras someterlas a estrés y/o incubarlas en condiciones alejadas de las óptimas (Baranyi, 2002; Guillier y col., 2005; Pin y Baranyi, 2008; Métris y col., 2008). Así mismo, se ha observado que los tiempos para la primera división son más largos y más variables entre células individuales de *Escherichia coli* que habían pasado un tiempo prolongado en fase estacionaria antes de la incubación (Pin y Baranyi, 2008).

Una interesante hipótesis relativa a la variabilidad de la fase de latencia de las células radica en la cantidad de trabajo que la célula tiene que hacer para restablecer el estado fisiológico que le permita multiplicarse, así mismo como la velocidad a que dicho trabajo puede llevarse a cabo (Robinson y col., 1998). Se asume que cada célula tendrá que llevar a cabo un trabajo para alcanzar un estado que la capacite para poder iniciar el crecimiento. Cada célula puede necesitar una serie de reparaciones de sus estructuras dañadas, activar algún gen, sintetizar enzimas o cualquier otro mecanismo imprescindible para que la multiplicación comience. En suma, cada célula puede necesitar una cantidad de trabajo diferente y, además, cabe la posibilidad de que la velocidad a la que se desarrollen esos trabajos sea también variable de unas células a otras o incluso de unos momentos a otros. Esta hipótesis tiene algún respaldo científico; se ha observado que las células de *Bacillus licheniformis* que tienen un alto pH intracelular empiezan a crecer antes en un medio ácido que aquellas que poseen un pH más ácido. En este caso, y de acuerdo con la hipótesis que acaba de enunciarse, el trabajo necesario para empezar la división celular consistiría en neutralizar el pH (Hornbaek y col., 2002).

No todos los microorganismos de la misma especie y de la misma población, tanto patógenos como alterantes, responden de igual manera ante situaciones idénticas en los alimentos (Aguirre y col., 2009a, b, c y d). Es decir, la variabilidad de las capacidades fisiológicas de los microorganismos hace que no todos actúen homogéneamente en bloque, ante las mismas condiciones. Razón por la cual, la variabilidad de las respuestas microbianas debe influir y considerarse en la predicción de la cinética de los

microorganismos. La profundización en el conocimiento de las capacidades fisiológicas microbianas y de su variabilidad puede ayudar a la industria alimentaria en su empeño por ofrecer productos más seguros y de mayor calidad microbiológica, ya que permitirán mejorar los modelos de crecimiento microbiano (Aguirre, 2012).

2 JUSTIFICACIÓN Y OBJETIVOS

La ciencia no consiste sólo en saber lo que debe o puede hacerse, sino también en saber lo que podría hacerse aunque quizá no debiera hacerse (Umberto Eco).

La globalización nos ha llevado a la integración de los mercados, que se traducen en drásticos cambios en el consumo de alimentos. Vivimos en un mundo en el que los avances tecnológicos y científicos nos llevan a una espiral evolutiva, cambiante, sin precedentes, no siendo los microorganismos y sus interacciones con nuestros alimentos y nuestra salud ajenos a ellos. El pequeño tamaño de los microorganismos, su velocidad de crecimiento, plasticidad fenotípica y variabilidad genética hacen que tengan una gran capacidad de adaptación y por tanto, pueden beneficiarse de tales cambios (McMeekin y Ross, 2002). Esta reflexión quizá ayude a comprender por qué aparecen microorganismos patógenos emergentes y reemergentes en los alimentos con cierta periodicidad (Lederberg, 1997).

Tradicionalmente, la gestión de la calidad y la seguridad alimentaria se ha basado en el control del producto final. Una vez fabricado el alimento, se muestrea, se analiza y se responde a la pregunta: ¿es seguro el producto, o no lo es? Como consecuencia de una mayor incidencia en las últimas décadas de emergencias sanitarias por contaminación de alimentos, tanto química como biológica, ha surgido la necesidad de replantearse la pregunta anterior al tiempo futuro: ¿será seguro el producto, o no lo será? Este replanteamiento implica una predicción, prever si el producto será o no seguro bajo ciertas condiciones y tras un cierto periodo de tiempo. Para responder a dicha pregunta se han desarrollado nuevas herramientas, siendo una de las más importantes, la microbiología predictiva. Los modelos se utilizan para predecir el desarrollo de microorganismos en alimentos y en otros productos mediante funciones matemáticas, que optimicen el procesado y permitan alcanzar el compromiso ideal entre calidad nutritiva, sensorial y sanitaria (Schöne, 2011).

No hay ninguna estrategia que asegure la ausencia total de microorganismos en los alimentos procesados, sin embargo se dispone de muchas herramientas para controlarlos. Es esencial pronosticar el crecimiento, la persistencia o la muerte de microorganismos, tanto patógenos como alterantes. En el procesado de los alimentos han de considerarse la seguridad alimentaria y propiedades sanitarias, nutritivas, y organolépticas de los alimentos. Todas son cruciales y más o menos críticas dependiendo del producto que se trate y, con cierta frecuencia, están enfrentadas. Una calidad organoléptica óptima puede conllevar unos riesgos microbiológicos inaceptables o viceversa. Los modelos microbiológicos predictivos pueden y deben optimizar el

procesado y permitir alcanzar el compromiso ideal entre calidad nutritiva, sensorial y sanitaria (Kennedy, 2008).

Las primeras corrientes del modelado microbiano seguían un procedimiento determinístico de la respuesta microbiana, es decir, asignaban valores rígidos, sin considerar posibles fluctuaciones ni hechos biológicos irrefutables. En los últimos años, muchos autores han confirmado la importancia de incluir dentro del modelado, los parámetros de variabilidad e incertidumbre (Delignette-Muller y Rosso, 2000; van Boekel, 2002; Koutsoumanis, 2008; Aguirre y col., 2009b; Aguirre y col., 2011), lo que se logra a través de modelos en los cuales la respuesta microbiana es considerada como una distribución de valores. Considerar la respuesta microbiana heterogénea o, lo que es lo mismo, variable, permite proporcionar escenarios más realistas, sobre todo de cara a la elaboración de estrategias preventivas en el aseguramiento de la evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico (Aguirre, 2012).

En esta tesis se plantea como objetivo global el estudio, desde un punto de vista matemático, la variabilidad de la inactivación microbiana mediante la acidificación y de la fase de latencia de los supervivientes a tal tratamiento, con el objetivo último de entender mejor la eficacia de los procesos de conservación de los productos alimenticios y contribuir con datos que, quizás, permitan mejorar la precisión de los modelos matemáticos predictivos del crecimiento microbiano, especialmente en lo que respecta a la fase de latencia.

Deben considerarse, por otro lado, los cambios sociales, a veces verdaderas convulsiones, que han disparado la demanda de alimentos cada vez más seguros, más nutritivos, más sabrosos y más parecidos a los naturales, sin olvidarnos de la evolución de los hábitos culinarios (consumo de carnes y pescados crudos, etc.), las nuevas tendencias de consumo (de comidas rápidas, productos precocinados, listos para el consumo, etc.), que han llevado a una revolución en el área de la producción y elaboración de estos alimentos, con especial atención a los procesos combinados, resumidos y divulgados en la tan manida “teoría de las vallas u obstáculos de Leistner”. En este contexto, la acidificación, utilizada por el hombre desde antaño, es un arma poderosa que potencia el efecto microbicida de otras operaciones; no es lo mismo un tratamiento con altas presiones a pH 7 que a pH 5 aunque este último sea tolerado por el microorganismo diana, ni es similar el valor D a $X^{\circ}\text{C}$ en pH neutro que en uno más

ácido. Hay sinergias, hay potenciación. En suma, la “ayuda” de una ligera acidificación a otra operación conservante permite una eficacia microbicida idéntica reduciendo la intensidad de esta última. Al fin y a la postre, se consigue ofrecer al consumidor un alimento menos procesado (quizás más parecido al natural), con (probablemente) mayor valor nutritivo y con (posiblemente) menos aditivos, aunque algo más ácido, cumpliendo (es de esperar) con sus querencias.

La acidificación de alimentos ha sido profusamente estudiada y evaluada, tanto mediante la adición directa de ácidos, como por fermentación. Sin embargo no se ha estudiado cuán variable puede ser el comportamiento microbiano ante condiciones acidificantes. En 2012 se defendió una Tesis que llevaba por título “Variabilidad de la inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a diferentes tratamientos conservantes de alimentos”. En ella se analizaron los tratamientos térmicos y la irradiación mediante electrones acelerados y se observó que la variabilidad existe, tanto en la inactivación como en la fase de latencia de los supervivientes a tales operaciones. Este trabajo es una prolongación de aquel, otra extremidad del mismo tronco, cuyo objetivo fundamental es comprender la magnitud de la variabilidad de la inactivación y del posible crecimiento microbiano en un alimento para dotar de instrumentos a la industria para un mejor control y una mayor seguridad de los productos que ofrece al consumidor. Considerar la respuesta microbiana heterogénea o, lo que es lo mismo variable, permite proporcionar escenarios más realistas, sobre todo de cara a la elaboración de estrategias preventivas en el aseguramiento de la evaluación cuantitativa del riesgo microbiológico (Aguirre, 2012).

Para ello, se han planteado los siguientes objetivos parciales:

1. Establecer la cinética de inactivación, tras recibir un tratamiento acidificante.
2. Analizar la variabilidad de la inactivación mediante tratamientos acidificantes.
3. Modelar la variabilidad de la inactivación mediante tratamientos acidificantes
4. Estudiar la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a tratamientos acidificantes de diferente intensidad.

5. Analizar la variabilidad de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a tratamientos acidificantes.
6. Modelar la variabilidad de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a tratamientos acidificantes.

En realidad, el objetivo final de la línea de investigación en la que está inmerso este trabajo es comprender mejor el comportamiento microbiano en dos facetas críticas para la industria alimentaria, la inactivación y la fase de latencia de aquellos microorganismos que pervivan en el producto y estén capacitados para multiplicarse en las condiciones de almacenamiento y distribución. Es obvio que, de alcanzarse este objetivo, la determinación de la vida útil de muchos alimentos será menos empírica y tendrá unas bases científicas más sólidas que las actuales, basadas en muchos casos en la experiencia más que en el conocimiento.

3 MATERIALES Y MÉTODOS

La inteligencia no sólo es el conocimiento, sino también es la destreza de aplicar los conocimientos en la práctica (Aristóteles).

3.1 MATERIAL GENERAL DE LABORATORIO

El material de vidrio empleado en las experiencias que se describen en esta tesis fue de tipo pirex, suministrado por proveedores de diversas casas comerciales.

El agua destilada utilizada para la preparación de los medios de cultivo, soluciones fisiológicas y las distintas disoluciones de los reactivos se obtuvo en un aparato Millipore Elix 3 que proporciona una calidad de agua con una resistividad de 15 MΩ.

Las pesadas ordinarias se realizaron en balanzas monopiano Kern: modelo 440-33, capacidad máxima 200 g.

El pH de los medios de cultivo, tampones, caldo de pollo y diferentes soluciones se midieron en un pH-metro digital HANNA Instruments, modelo HI 4211, con electrodo combinado de pH con cuerpo de vidrio y sonda de temperatura. El pHmetro se calibró a valores de pH $4,0 \pm 0,002$ (20°C) y $7,0 \pm 0,002$ (20°C) con soluciones tampón de referencia suministradas por Panreac.

Los microorganismos se mantuvieron en congelación (-20°C) en cámaras Liebher; el material biológico (caldo de pollo) y todo el material estéril se conservó en frigoríficos de las marcas Kelvinator y Frikey a 5°C.

La incubación de las cepas para la revitalización de los microorganismos y la incubación de las placas para los recuentos se llevaron a cabo en estufas Heraeus y J.P. Selecta, S.A., termostatadas a la temperatura óptima de crecimiento de los microorganismos estudiados en esta tesis.

Para la mezcla y homogenización de las muestras se emplearon agitadores de tubos tipo vórtex Bunsen, modelo AGT-9. Las disoluciones y los medios de cultivo se prepararon con agitador magnético Bunsen, modelo MC 8, dotados de calefacción que se activó cuando fue necesario.

Los medios de cultivo y el material general de laboratorio se esterilizaron en autoclaves Selecta, modelos Autotester-G, Autotester-E y Presoclave-II a 121°C durante 15 min. Previamente a su distribución en placas de Petri, los medios de cultivo

se mantuvieron a 50°C en baños provisto de termostato de inmersión de la marca Bunsen, modelo TFB.

Cuando fue necesario centrifugar las muestras, se hizo en centrífuga refrigerada Sorvall RC-5B, equipada con rotores GSA, GS3 y S600.

Para la siembra de los medios de cultivo se utilizó un sistema automático de siembra en espiral IUL Instruments, modelo Eddy Jet TelStar AV-100. En algunos casos, se sembró en profundidad, para ello se vertió el medio de cultivo estéril (50°C) en placas de Petri. Se sembraban 40 ó 100 µl dependiendo del número de viables esperados. El recuento de microorganismos se realizó en un analizador de imagen IUL Instruments, modelo Counter Flash.

Se emplearon pipetas automáticas de las marcas BIOHIT y Discovery Comfort, que dispensan volúmenes de 2 - 20 µl, 20 - 200 µl, 100 - 1000 µl y 1 - 5 ml.

3.2 OTROS MATERIALES

- Tubos de ensayo con tapas rosca y tapas a presión.
- Tubos para centrifuga de polipropileno autoclavables.
- Frascos de vidrio de 50 ml, 500 ml y 1000 ml.
- Probetas de vidrio y de plástico de 100 ml y 500 ml.
- Vasos de precipitado de 50 ml, 500 ml y 1000 ml.
- Puntas de pipetas de: 2 – 200 µl, 100 – 1000 µl y 1-5 ml.
- Tubos eppendorf 1,5 ml.
- Placas de Petri estériles de 90 milímetros de diámetro.
- Mecheros Bunsen.
- Asas bacteriológicas y asas de vidrio Drigalski (triangulares).
- Cámara de flujo laminar Telstar, modelo AV-100.
- Contador de colonias manual, marca J.P. Selecta S.A.
- Agitador magnético Speedsafe™, marca HANNA Instruments.
- Temporizador reloj digital, modelo 882.
- Cajas reutilizables para puntas. Botes de plástico autoclavables.
- Gradillas rectangulares con tapa para tubos eppendorf.
- Gradillas para tubos (metálicas y plástico).

- Papel de aluminio y papel de filtro.
- Cintas de autoclave.
- Guantes desechables.
- Bombillas para Bioscreen C.
- Espátulas metálicas.
- Alcohol al 70%.
- Antiséptico para manos.
- Material de escritorio en general.
- Ordenadores e impresora.

3.3 MATERIAL BIOLÓGICO

3.3.1 Muestras de caldo de pollo

Para la realización de las distintas experiencias, la matriz alimentaria que se utilizó fue caldo de pollo Don SimonTM (Almería, España). Sus ingredientes son caldo de pollo (pollo, zanahoria, cebolla, perejil, agua, aceite de oliva virgen extra y sal), fécula de maíz y aromas. El caldo de pollo se adquirió en distintos centros comerciales y supermercados, y se encuentra en la lineal de temperatura ambiente. Dada su naturaleza, no precisó condiciones especiales para su transporte y almacenamiento. Cuando se adquirirían nuevos envases, siempre se controlaba su pH.

3.3.2 Microorganismos

Se han usado cuatro microorganismos:

- *Enterococcus faecalis* (LM24), hasta 1984 se conocía como *Streptococcus faecalis* (Scheleifer y Kilpper, 1984). Bacteria Gram-positiva del género *Enterococcus*. Es un microorganismo ubicuo, que puede encontrarse en hábitats muy diferentes y con frecuencia es contaminante de muchos alimentos. Son muy resistentes a distintas condiciones adversas como congelación, desecación, tratamiento térmico, etc., por lo que son buenos indicadores para valorar las condiciones higiénicas y de conservación de los alimentos refrigerados, congelados y desecados (Ryan y Ray, 2004).

- *Listeria innocua* (CECT 910; NTC 11288; ATCC 33090). Es una bacteria Gram-positiva, inocua como su nombre indica, muy utilizada en investigación por ser subrogada de la patógena *Listeria monocytogenes*. Este microorganismo pueda aislarse en cualquier punto de la cadena de producción-consumo si existe un sustrato apropiado para su supervivencia y proliferación, crece con relativa facilidad a temperaturas bajas (menores a 4°C) y es bastante resistente a una infinidad de condiciones (Walker y col., 1990).
- *Salmonella enterica* serovar Enteritidis (CECT 4300; ATCC 13076), bacteria patógena, Gram-negativa. Habitante habitual de la superficie de los huevos y de aquellos frutos y verduras que tienen contacto con la tierra. Es uno de los causantes más frecuentes de toxiinfecciones alimentarias.
- *Pseudomonas fluorescens* (CECT 378) Gram-negativa y psicrotrofa. Es un típico alterante de productos frescos mantenidos en refrigeración, debido a que puede multiplicarse más rápidamente que la mayor parte de los microorganismos a temperaturas de refrigeración.

3.4 REACTIVOS Y MEDIOS DE CULTIVO

Los reactivos y soluciones acidificantes utilizadas en las experiencias que se describen en esta memoria fueron suministrados por Panreac, Merck y Sigma.

Los medios de cultivos y diluyentes deshidratados se reconstituyeron de acuerdo con las instrucciones de sus proveedores: Difco, Oxoid y Pronadisa.

Se emplearon los siguientes medios de cultivo y soluciones:

- Para la revitalización de los microorganismos se utilizó caldo tripticaseína soja (Trypticasein Soy Broth, TSB) en tubos de ensayo que se incubaron a 37°C durante 24 horas para todos excepto *Pseudomonas fluorescens*, que se incubó a 25°C durante 36 horas.
- Para la enumeración de las bacterias viables en caldo de pollo y en los otros sustratos y sobrenadantes obtenidos tras la centrifugación se utilizó agar tripticaseína soja (Trypticasein Soy Agar, TSA). Las placas sembradas se

incubaron a la temperatura óptima de crecimiento de cada microorganismo durante 24 horas, excepto *P. fluorescens* que lo fue durante 36 horas.

- Para los controles positivos se utilizaron: agar Palcam para *Listeria spp.*, agar Slanetz & Bartley selectivo para *Enterococcus*, agar S.S. para cepas de *Salmonella* y agar Pseudomonas para *Pseudomonas spp.* Estas placas se incubaban a la temperatura óptima de cada microorganismo durante 24 - 48 horas.
- Agua de peptona tamponada (Buffered peptone water), ajustada a los pHs adecuados para los diferentes experimentos programados.
- Tampón citrato 0,1 N ($C_6H_8O_7$ y $C_6H_5O_7Na_3 \cdot 2H_2O$) ajustado a los pHs adecuados para los diferentes experimentos programados.
- Tampón fosfato 0,2 N (Na_2HPO_4 y $NaH_2PO_4 \cdot H_2O$), pH 7,0. Solución utilizada para finalizar la acción del tratamiento acidificante.
- Ácido acético (CH_3-COOH), solución utilizada para ajustar el pH de la matriz alimentaria y del agua de peptona tamponada.
- Ácido clorhídrico 0,5 N (HCl), solución utilizada para ajustar el pH del TSB en diversas experiencias.
- Solución salina estéril (NaCl) al 0,80%.

3.5 MÉTODOS MICROBIOLOGICOS

3.5.1 Revitalización de los microorganismos y preparación del inóculo bacteriano

Las cepas de *E. faecalis*, *L. innocua*, *S. Enteritidis* y *P. fluorescens* se mantuvieron en congelación (-20°C) en caldo TSB con un 10% de glicerol como agente criogénico.

A partir del stock en congelación, con ayuda de una micropipeta se revitalizaron 40 µl de la cepa en estudio, mediante un pase a tubos con 9 ml de TSB, los tubos inoculados se incubaron a 37°C durante 24 horas, con excepción de *Pseudomonas*

fluorescens, la cual fue incubada a 25°C durante 36 horas (procedimiento realizado en todas las etapas de revitalización de las cepas). Tras este pase, se sembró 1 ml en tubos de centrifuga estériles con 20 ml de TSB, incubándose otras 24 horas a las condiciones antes mencionadas (36 h en el caso de *P. fluorescens*) para concluir con la revitalización. A continuación se centrifugaron a $14.000 \times g$, $5 \pm 1^\circ\text{C}$ durante 9 minutos y el sobrenadante se desechó. Para homogenizar las células sedimentadas se resuspendieron en 10 ml de solución salina estéril (0,80% NaCl). Esta operación se repitió una segunda vez para arrastrar más células y finalmente el volumen de suspensión celular se llevó hasta 50 ml con solución salina estéril (0,80% NaCl), con el fin de normalizar el inóculo que posteriormente se utilizaría en diferentes experiencias. Este protocolo se siguió estrictamente en todos los ensayos experimentales de inactivación microbiana a tratamientos acidificantes. La Figura 8 muestra el diagrama del procedimiento.

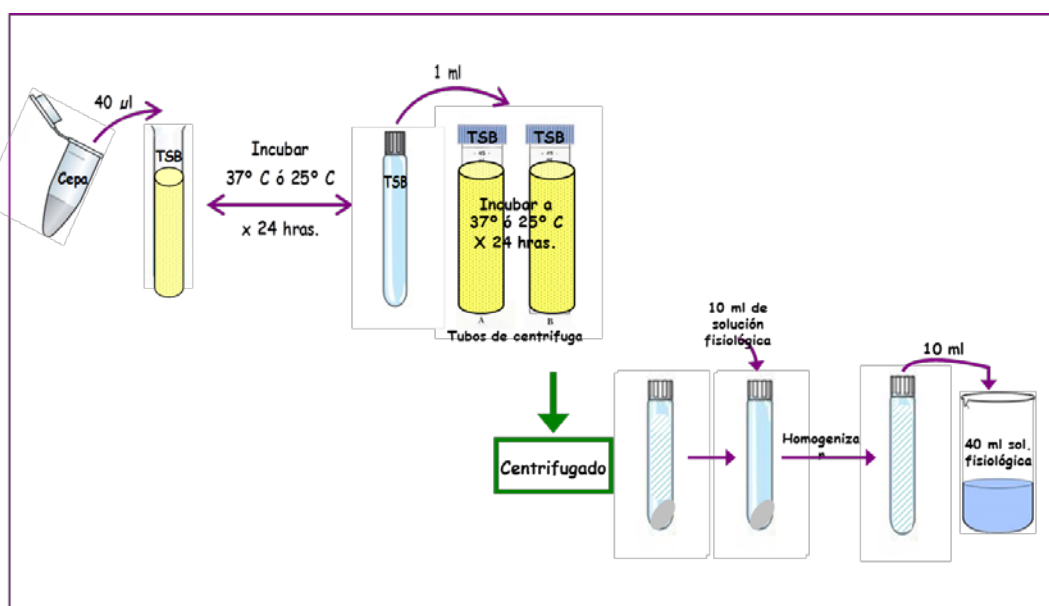


Figura 8. Esquema de la reactivación y preparación del inóculo.

3.6 CONDICIONES EXPERIMENTALES

3.6.1 Inóculo inicial

En primer lugar se determinaba la concentración inicial de microorganismos en la suspensión. Para ello, se prepararon diluciones decimales en TSB estéril de la solución madre preparada de acuerdo con lo descrito en el apartado 4.5.1 y los microorganismos

viables se contaron en placas TSA por triplicado, para el recuento se sembraron 40 μ l de las diluciones adecuadas (dilución -4 y/o dilución -5) en placas de TSA, que se incubaron a la temperatura óptima del microorganismo en estudio durante 36 horas, excepto para *P. fluorescens* (72 horas). Tras la incubación, los resultados se expresaron como la media de los recuentos obtenidos.

La concentración inicial aproximada de cada uno de los 4 microorganismos en 50 ml es de 10^8 ufc/ml.

3.6.2 Inactivación de los microorganismos mediante acidificación

Para realizar los ensayos de inactivación por acidificación se diluyó 100 veces el inóculo de partida (10^8 ucf/ml) para obtener una concentración microbiana de 10^6 ufc/ml. Por otro lado se prepararon tubos de ensayo, cada uno con 9 ml de uno de los siguientes sustratos: tampón citrato, caldo de pollo y agua de peptona, ajustándose el pH a 2'5, 3'0, 3'5 y 4'0. El pH de los dos últimos se ajustó con ácido acético. En total se trabajó con 3 sustratos y 4 pHs para cada uno de ellos, analizándose 12 muestras para cada condición.

En cada tubo se inoculó 1 ml que contenía aproximadamente 10^6 ufc/ml. Tras agitarlos convenientemente, las bacterias se mantuvieron a los pHs mencionados durante 1 hora, tomándose muestras de 100 μ l al principio cada minuto hasta llegar a los 10 minutos y posteriormente cada 5 minutos, con lo que se obtuvieron un total de 20 muestras de cada condición. Los 100 μ l tomados se mezclaron con 900 μ l de tampón fosfato estéril (0,2 N) a pH 7,0 con el fin de detener el shock ácido. Para el recuento de los supervivientes se sembraron 40 μ l de las diluciones adecuadas en placas de TSA que se incubaron a la temperatura óptima del microorganismo en estudio durante 36 horas, excepto para *P. fluorescens* (72 horas). Tras la incubación, se contaron los viables con ayuda del contador de colonias manual. Este protocolo se esquematiza en la Figura 9.

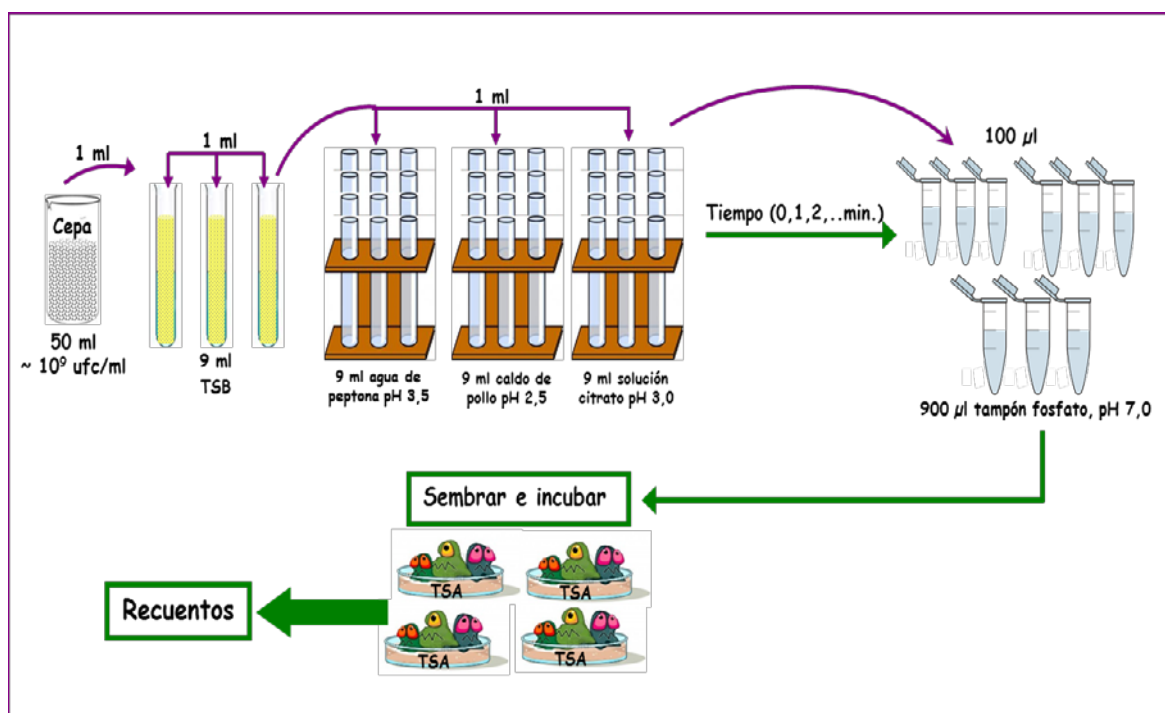


Figura 9. Inactivación microbiana en diferentes sustratos a diferentes pHs.

Los resultados del número de supervivientes de *E. faecalis*, *L. innocua*, *S. Enteritidis* y *P. fluorescens* se analizaron en una hoja de cálculo Excel, con la que se determinaron los parámetros de la cinética de inactivación microbiana. Estos datos son fundamentales para después programar unas condiciones de inactivación que produjeran unos efectos microbicidas preestablecidos.

3.6.3 Parámetros cinéticos de inactivación - valores D_{pH} y z_{pH}

Valor D_{pH}

El concepto de valor D es bien conocido a raíz de los modelos de inactivación térmica y constituye uno de los parámetros cinéticos más representativos para estudiar la inactivación microbiana que sigue una cinética de primer orden.

El valor D_{pH} es el tiempo necesario a un pH determinado, para que el número de viables de una población microbiana disminuya en un 90%.

El valor D_{pH} puede calcularse por medio de una gráfica en la que se representa el \log_{10} del número de supervivientes en función del tiempo, en la que este valor es el inverso del valor absoluto de la pendiente de la recta de regresión resultante.

$$D_{pH} = \frac{1}{|\text{Pendiente}|} \quad (19)$$

Alternativamente se puede calcular a partir de la ecuación:

$$D_{pH} = (t_2 - t_1) / (\log N_1 - \log N_2) \quad (20)$$

En la que N_1 y N_2 son el número de supervivientes existentes en los tiempo t_1 y t_2 respectivamente.

En este trabajo se ha empleado la representación gráfica obtenida en una hoja de cálculo Excel para la estimación de dicho parámetro, como se muestra en la Figura 10.

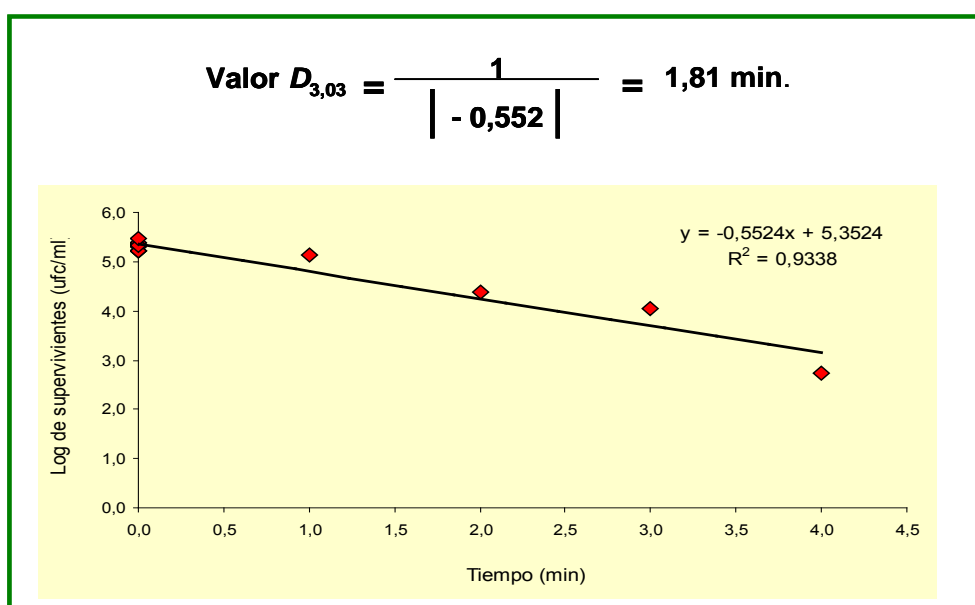


Figura 10. Valor D_{pH} calculado experimentalmente para la inactivación de *Enterococcus faecalis* en agua de peptona/ácido acético. Dato mostrado en la Tabla 5.

Valor z_{pH}

El valor z_{pH} es un parámetro expresado en unidades de pH, que permite relacionar los valores D_{pH} obtenidos en diferentes condiciones. El valor z_{pH} se puede calcular, como en el caso anterior, gráficamente tras representar los logaritmos de los valores D_{pH} en función del pH. El valor z_{pH} será la inversa del valor absoluto de la pendiente de la recta de regresión resultante:

$$z_{pH} = \frac{1}{|\text{Pendiente}|} \quad (21)$$

Y matemáticamente, a partir de los datos obtenidos:

$$z_{pH} = (pH_2 - pH_1) / (\log D_{pH1} - \log D_{pH2}) \quad (22)$$

En este trabajo siempre se utilizó el método gráfico con ayuda de una hoja de cálculo Excel para la determinación del valor z_{pH} , como se muestra en la Figura 11.

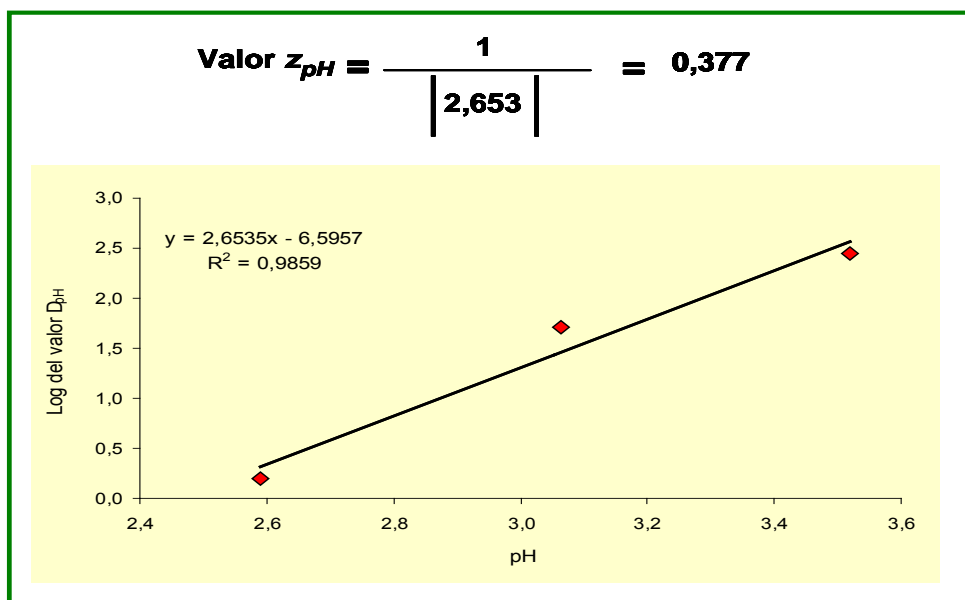


Figura 11. Valor z_{pH} calculado experimentalmente para *Enterococcus faecalis* en caldo de pollo/ácido acético. Datos mostrados en la Tabla 5.

3.7 ESTIMACIÓN DE LA FASE DE LATENCIA MICROBIANA

3.7.1 Bioscreen

El equipo Bioscreen C es un turbidímetro controlado por software. Este equipo permite estudiar el crecimiento bacteriano mediante la turbidez que genera. En este equipo pueden ajustarse diferentes parámetros, como la longitud de onda, temperatura de incubación, frecuencia e intensidad de agitación, intervalos de tiempo entre dos medidas y duración global del experimento. El Bioscreen C (Fig.12) está compuesto por dos partes: un espectrómetro y un fotómetro. El espectrómetro proporciona luz a

una longitud de onda específica y el fotómetro mide la intensidad de luz que atraviesa la suspensión microbiana (Presser y col., 1998).

En este estudio en particular, sirve para cuantificar el número de microorganismos en un medio líquido (es un método indirecto) basado en el hecho de que las células bacterianas, dependiendo de su concentración, tamaño y forma, son capaces de absorber y dispersar un haz de luz incidente. El Bioscreen dispone de un filtro de banda ancha para longitud de onda de 420 – 580 nm. La luz emitida incide sobre las células y la absorbancia que registra el equipo está en función del número de células existentes. No obstante, esto solo es cierto a partir de una concentración bacteriana concreta, en torno a $10^6 - 10^7$ ufc/ml, dependiendo de la naturaleza y, sobre todo, del tamaño del microorganismo.



Figura 12. Bioscreen.

La gran ventaja que ofrece este equipo es, trabajar simultáneamente con 200 muestras distribuidas en dos placas cubiertas de nido de abeja (10×10 pocillos), ofreciendo la posibilidad de generar una gran cantidad de réplicas, garantizando idénticas condiciones de trabajo. La aplicación más relevante de este equipo en el marco de esta tesis es el cálculo de la fase de latencia de células individualizadas.

3.7.1.1 Curvas de crecimiento en Bioscreen

Las curvas de crecimiento fueron obtenidas mediante mediciones turbidimétricas a 420 – 580 nm en función del tiempo en el equipo Bioscreen C.

Con el fin de conocer la capacidad de crecimiento de los microorganismos en estudio a diferentes pHs. Se estudió el posible desarrollo microbiano en TSB acidificado con ácido acético o con HCl (0,5 N) en el intervalo de pH 4 hasta pH 6.

A partir del stock en congelación, con ayuda de una micropipeta se revitalizaron 40 µl de la cepa en estudio, mediante un pase a tubos con 9 ml de TSB, los tubos inoculados se incubaron a 37°C durante 24 horas, con excepción de *Pseudomonas fluorescens*, la cual fue incubada a 25°C durante 36 horas. Tras la incubación, se diluyó hasta alcanzar la concentración microbiana deseada (10^3 y 10^2 ufc/ml).

Posteriormente se incubaron 10 pocillos con 270 µl de TSB/ácido acético ó TSB/HCl a pH 4,0 y así sucesivamente hasta pH 6. Seguidamente se siembran 30 µl del cultivo en estudio en cada pocillo. La temperatura del Bioscreen se ajusta a la deseada y se mantiene constante durante todo el periodo de incubación. El equipo se programa para que determine la absorbancia cada 30 minutos, por regla general, y justo antes de medirla, las dos placas que se están incubando se agitan durante 10 segundos para favorecer que las células estén en suspensión y minimizar el riesgo de que sedimenten a lo largo de la incubación, lo que acarrearía errores de medida al formarse un residuo opaco en el fondo de los pocillos. Todos los datos quedan registrados en una hoja de cálculo Excel. El número medio de microorganismos inoculados en cada pocillo se controla recontando el número de viables por ml en TSA por quintuplicado.

Una vez graficadas las curvas de crecimiento, observamos que el ácido acético provocaba la inactivación de los microorganismos y no permitía el crecimiento por debajo de pH 5,1 y por encima de este valor se apreciaba el desarrollo microbiano de una forma inconstante, es decir, en algunos pocillos se observaba un buen crecimiento mientras que en otros éste era pobre o incluso no había crecimiento, hasta un pH de 5'8, en el que el crecimiento ya era más regular. En cambio, en TSB acidificado con HCl (0,5 N) se observó una mayor repetitividad del crecimiento microbiano, por lo que se decidió trabajar exclusivamente con este medio.

3.7.1.2 Crecimiento a diferentes pHs

Una vez revitalizadas las células como indica en el apartado 3.5.1, se diluyó hasta alcanzar la concentración microbiana deseada. La concentración microbiana, siempre que no se indique otra cosa, se pretendía que fuera 1 célula por pocillo. En cada pocillo se depositaban 30 μ l del cultivo en estudio, por regla general compuestos de 270 μ l de TSB/HCl 0,5N a pH 5,0 otros 20 pocillos con 5,1 y así sucesivamente hasta pH 6,0. Con posterioridad se incuban las microplacas a 20°C en el Bioscreen durante 4 ó 5 días. El equipo se programa para que determine la absorbancia-transmitancia- de la suspensión microbiana cada cierto tiempo, a partir de esta etapa se repite el protocolo del apartado 3.7.1.1. Todos los datos quedan registrados en una hoja de cálculo Excel, que permite la obtención de gráficas con curvas de crecimiento como las que se muestran en la Figura 13.

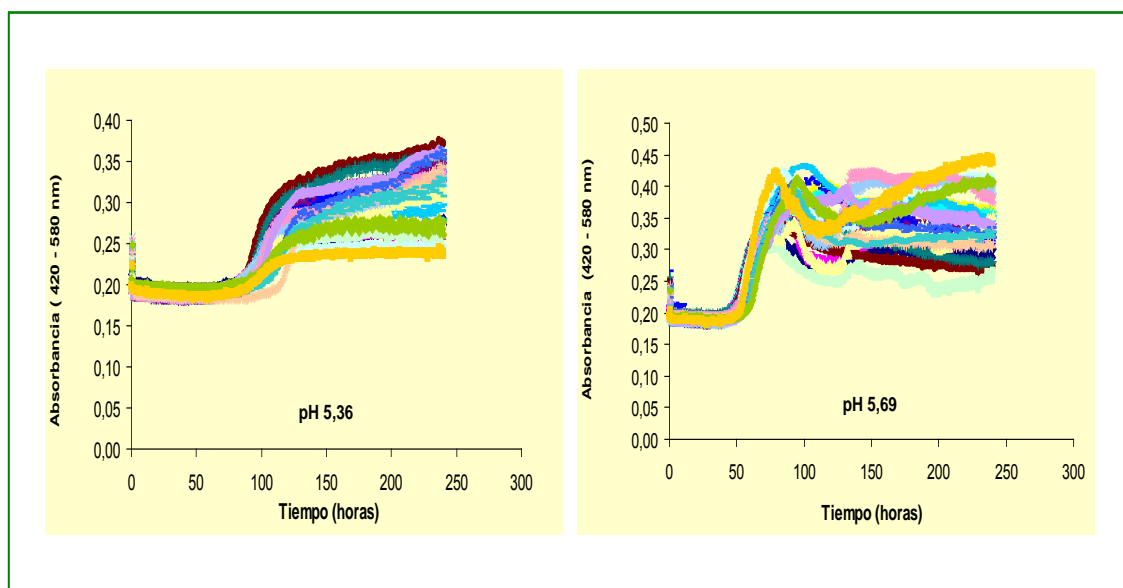


Figura 13. Ejemplos de curvas de crecimiento obtenidas en el Bioscreen con *Listeria innocua* en TSB/HCl (0,5 N) a pHs ácidos incubadas a 20°C. También se muestran en la Figura 38.

El control del número medio de microorganismos inoculados por pocillo es el recuento del número de viables por ml en TSA por quintuplicado. Este dato es necesario para poder, posteriormente, calcular el tiempo que tarda dicho inóculo en alcanzar una determinada absorbancia que se corresponde con una cantidad de microorganismos que es necesario determinar (véase 3.7.1.2) de esta manera puede cuantificarse la fase de latencia (véase 3.7.4).

3.7.1.3 Cálculo de N_d y curvas de calibración de la concentración microbiana

Considerando lo que acaba de decirse, fue necesario estimar el N_d (número de microorganismos que generan una absorbancia determinada, en este caso 0,25), para cada microorganismo, que es calculada de acuerdo a una curva patrón. Para este cálculo se revitalizan las bacterias en estudio como se indica en el apartado 3.5.1, incubándose a temperaturas óptimas de crecimiento durante 24 horas para el medio TSB a pH 7,0, y 48 horas en TSB/HCl a pH 5 que se incubaron durante 48 horas, tiempo necesario para que se adapten a las condiciones ácidas del medio y alcancen una concentración aproximada de 10^8 ufc/ml. El pH del TSB se ajustó a 5,0 con HCl 0,5 N en un pH-metro digital descrito en el apartado 3.1. El pH del TSB fresco suele rondar la neutralidad por lo que no se suele ajustar su pH a 7,0. Manteniendo las condiciones de esterilidad; diferentes diluciones de los 4 microorganismos con las que se ha trabajado en esta tesis, se diluyeron en TSB a pH 7 y pH 5 respectivamente, con el fin de obtener distintas concentraciones celulares (desde 10^1 hasta 10^6 ufc/ml). A continuación se sembraron 300 μ l de las distintas concentraciones celulares diluidas en TSB a pH 7 en 15 pocillos del Bioscreen (protocolo desarrollado por Francois y col., 2003), con lo que se podían obtener 90 curvas de crecimiento. Se procedió de igual manera con el sustrato ajustado a pH 5,0 en la otra microplaca (Fig. 14). Los microorganismos desarrollaron una turbidez similar en ambos sustratos (TSB/pH 7 y TSB/pH 5).

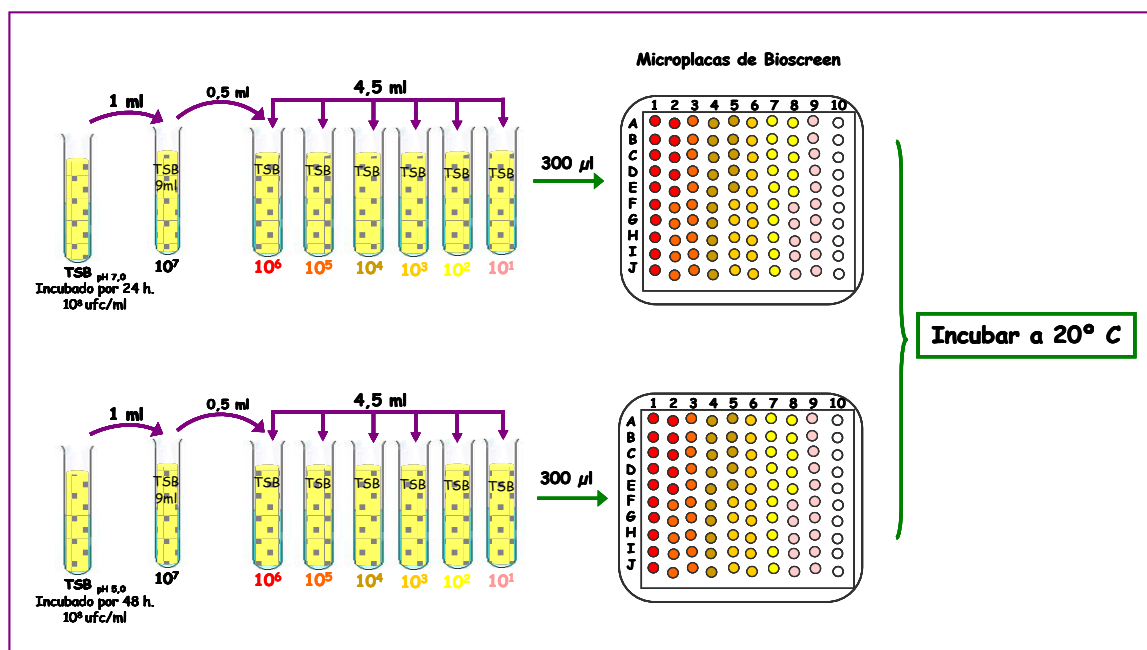


Figura 14. Obtención de distintas concentraciones celulares de *E. faecalis*, *L. innocua*, *S. Enteritidis* y *P. fluorescens* en TSB a pH 7 y TSB/HCl (0,5 N) pH 5 y su distribución en microplacas de Bioscreen.

Las curvas de calibración, una para cada concentración microbiana, relacionan el número de viables en cada pocillo con la absorbancia de luz en ese pocillo. Los datos expresados en medidas de absorbancia se transforman en recuento celular mediante una curva de calibración. Para cada curva de calibración se obtuvieron, al menos, 4 ó 8 puntos en el intervalo de absorbancias entre 0,22 y 0,28 unidades. Dichos puntos se graficaron y la recta de regresión ajustada por el método de los cuadrados mínimos permite estimar qué concentración microbiana se espera para cada absorbancia. Por lo tanto las curvas de calibración, expresan la relación existentes entre las medidas de DO con una concentración microbiana que se ajusta a una ecuación lineal. Este dato es imprescindible para el posterior cálculo de la fase de latencia de células individualizadas como se verá más adelante

3.7.2 Tiempo de detección (T_d)

El tiempo de detección es el tiempo transcurrido desde el inicio de la incubación hasta que se alcanza una turbidez igual a 0,25 unidades de absorbancia. Esta absorbancia se escogió de forma arbitraria. La razón de elegir esa y no otra estriba en que el medio de cultivo sin que exista turbidez alguna, incluso estéril, presenta cierta absorbancia, que ronda las 0,20 unidades en las condiciones reales de medida, no

siendo un valor constante. Por otra parte, como se verá a continuación, para que un cultivo desarrolle turbidez es necesario un número de microorganismos elevado, en torno a $10^6 - 10^7$ ufc/pocillo, y cuando un cultivo alcanza tal concentración celular es probable que su velocidad de crecimiento comience a declinar si no lo ha hecho ya previamente (dependiendo de las condiciones ambientales), por lo que es preferible fijar la detección en la absorbancia más baja posible, pero siempre algunas décimas por encima de la umbral del medio de cultivo, para asegurar que esa absorbancia se debe al crecimiento microbiano a la vez que no conviene que la absorbancia esté demasiado por encima de la umbral porque implicaría una concentración celular muy elevada, que podría acercarse en exceso a la que se alcanza en fase estacionaria.

En el apartado 3.7.1.2 se ha especificado el método seguido en Bioscreen, del que se obtenía una absorbancia cada 30 minutos en los 200 pocillos que componen las dos microplacas. Considerando la ingente cantidad de datos que eso implica, se hizo necesario protocolizar la determinación del tiempo de detección. Con los datos obtenidos en el Bioscreen se seleccionan todas las absorbancias comprendidas en los intervalos $[0,22 \leq \mathbf{0,25} \leq 0,28]$ unidades de absorbancia. Estas absorbancias representadas gráficamente generan una recta de regresión con los tiempos de incubación precisos para alcanzar tales absorbancias. Sustituyendo la variable “y” por 0,25 y despejando “x” en la ecuación de la recta se obtienen los valores del T_d . La Figura 15 es un ejemplo de la representación gráfica de la ecuación de la recta de regresión. En este caso, el tiempo de detección fue de 29,52 horas.

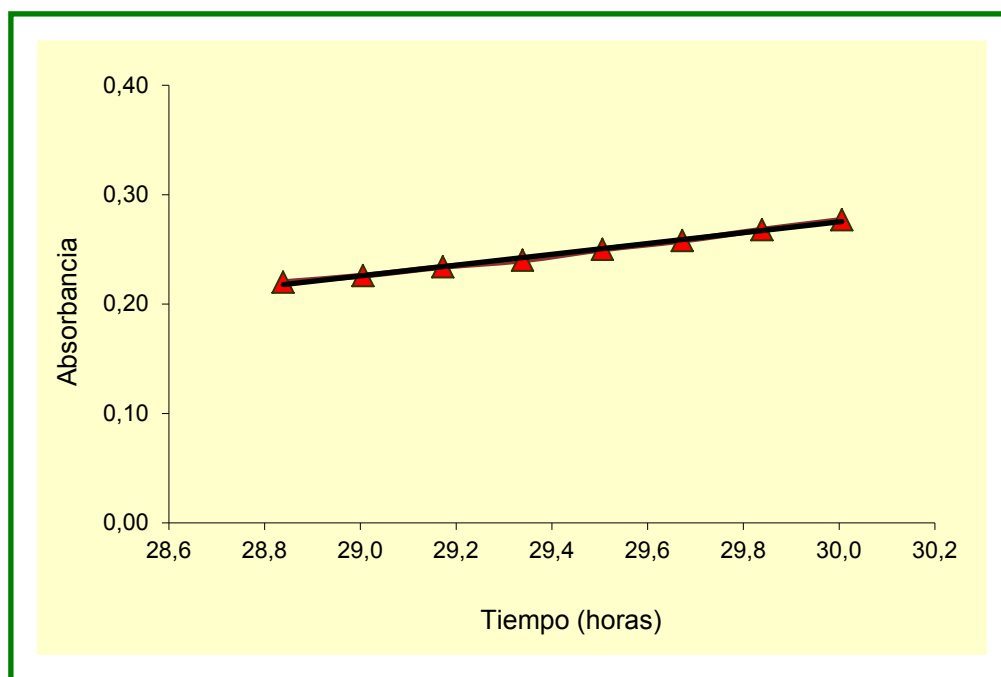


Figura 15. Ejemplo del cálculo del tiempo de detección. Datos experimentales del crecimiento de *E. faecalis* en TSB a pH 7,30 a 20°C. Con la ecuación se estima el tiempo necesario para que se alcancen 0,25 unidades de absorbancia en el Bioscreen.

3.7.3 Tasa máxima de crecimiento (μ_{max})

La tasa de máximo crecimiento (μ_{max}), es la velocidad máxima de crecimiento microbiano por unidad de tiempo. Es un parámetro tan constante como lo es el tiempo de generación y depende exclusivamente del microorganismo y de las condiciones del medio de crecimiento.

El valor μ_{max} puede calcularse gráficamente (ver Figura 16), a partir del ángulo formado por la tangente y el eje de las abscisas en la recta imaginaria que coincide con la porción recta de la curva de crecimiento.

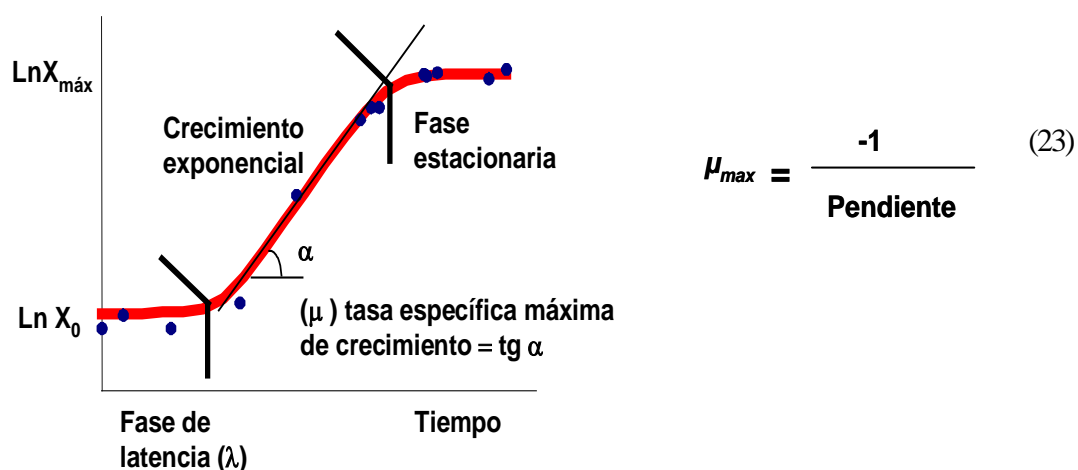


Figura 16. Curva de crecimiento microbiano.

Y matemáticamente puede calcularse de la siguiente manera:

$$\mu_{max} = (\text{Ln } X - \text{Ln } X_0) / (TX - \text{Lag}) \quad (24)$$

Dónde: $\text{Ln } X_0$ es la concentración microbiana inicial, $\text{Ln } X$ es la concentración microbiana en un momento determinado del crecimiento exponencial y TX el tiempo transcurrido desde la inoculación hasta el momento del recuento que da X y, Lag , fase de latencia.

μ_{max} también puede calcularse a partir de mediciones DO obtenidos en el Bioscreen, según el método descrito por Robinson y col. (1998) y Métris y col. (2006). Para ello han de sembrarse diferentes concentraciones microbianas en un número representativo de pocillos (al menos 20) y medir los tiempos que tardan tales diluciones en llegar al tiempo de detección. Seguidamente se representan los datos obtenidos gráficamente, se obtiene la recta de regresión de tales puntos y el inverso del valor absoluto de la pendiente de la recta resultante es igual a la tasa específica de máximo crecimiento. La Figura 17 es un ejemplo de esta determinación.

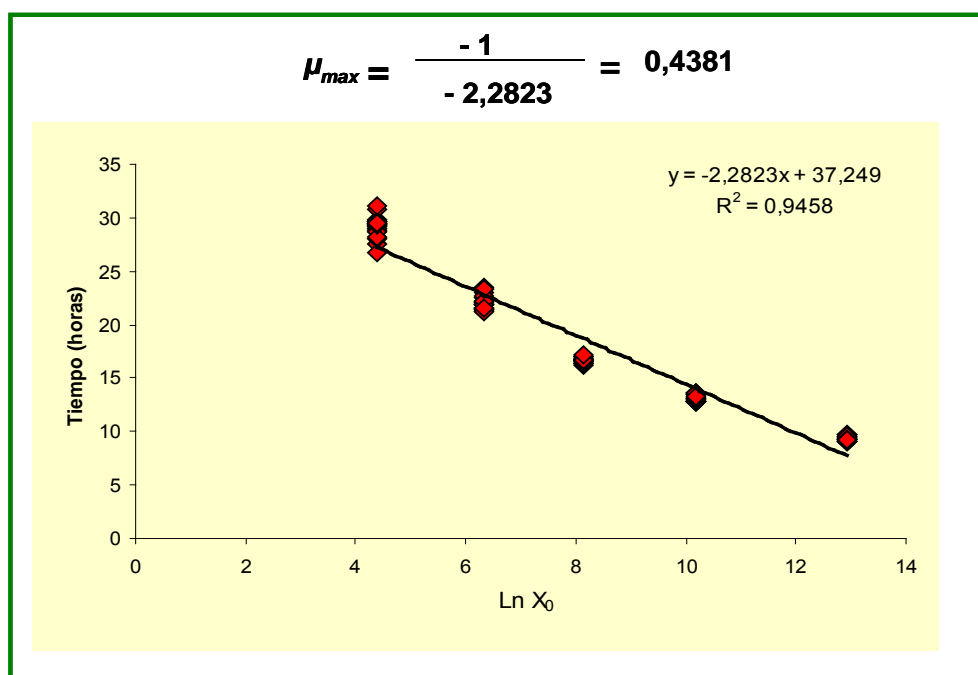


Figura 17. Determinación de la μ_{max} de *E. faecalis* en TSB a pH 7,30 a 20°C, en Bioscreen (dato mostrado en la Fig. 43 y la Tabla 11). Cada concentración microbiana (Ln X₀) se obtuvo con 20 valores de T_d .

La variabilidad del estado fisiológico de las células (en los pocillos) estimadas experimentalmente a través del N_d , T_d y μ_{max} (DO = 0,25) son funciones de la fase de latencia en células individuales a determinadas condiciones, y de acuerdo con la Ecuación (25), puede transformarse fácilmente en fases de latencia (tal como se explica en el siguiente apartado).

3.7.4 Fase de latencia

En el ámbito de este trabajo, la fase de latencia se considera el tiempo necesario para que una población comience a multiplicarse (Buchanan y Klawiter, 1991) Figura 18. Asimismo la fase de latencia de células individualizadas es el tiempo transcurrido desde que se inicia la incubación hasta que la célula se divide.

Los tiempos de la fase de latencia de una sola célula se monitorizaron mediante medidas de absorbancia en el Bioscreen. El límite de detección del crecimiento fue establecido en 0,25 unidades de absorbancia, además los cálculos del tiempo de fase de latencia son fácilmente estimados a partir de N_d y T_d y μ_{max} , estimados previamente. Sin embargo μ_{max} es un valor muy sensible; razón por la deben extremarse las precauciones en su cálculo.

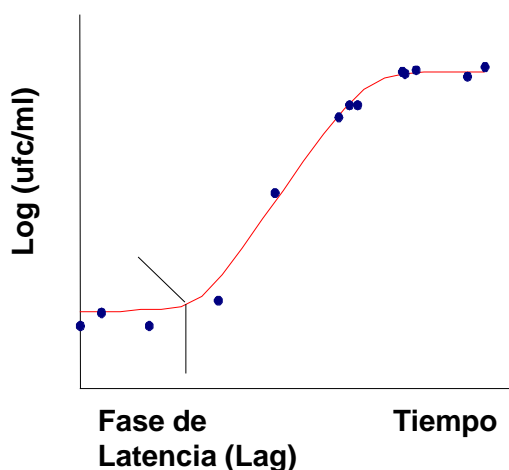


Figura 18. Representación esquemática de la fase de latencia en una curva de crecimiento microbiana.

El cálculo de la fase de latencia se hizo de acuerdo con la Ecuación de Baranyi y Pin (1999), y siempre con la ayuda de una hoja de cálculo de Excel:

$$Lag = T_d - \left(\frac{Ln(N_d) - Ln(N_0)}{\mu_{max}} \right) \quad (25)$$

Donde T_d es el tiempo de detección necesario para alcanzar 0,25 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 420-580 nm (datos obtenidos en el apartado 3.7.2), $Ln(N_d)$ es el número de bacterias que generan la turbidez de 0,25 unidades (es decir 10^{6-7} ufc/pocillo), $Ln(N_0)$ es la carga inicial de bacterias, que si es 1 célula bacteriana, es igual a 0. La μ_{max} es la tasa máxima de crecimiento en las condiciones del cultivo, que se asume constante en todas las fases de latencia de crecimiento exponencial (datos obtenidos en el apartado 3.7.3), y T_d es el tiempo transcurrido desde el inicio de la incubación hasta que se alcanza una turbidez igual a 0,25.

3.8 TRATAMIENTOS DE INACTIVACIÓN ÁCIDA

3.8.1 Variabilidad de la inactivación en tres sustratos

Para conseguir este objetivo se programaron 4 ensayos idénticos para cada microorganismo. Con cada uno de ellos se utilizaron tres lotes de entre 50 y 80 tubos (muestras) a pHs inactivantes, más un cuarto lote a pH 7,0 como lote control, con un mínimo de 10 tubos. Todos los tubos contenían 4,5 ml de uno de estos medios, siempre

en esterilidad: tampón citrato, agua de peptona/ácido acético ó caldo de pollo/ácido acético. El pH de estos sustratos se ajustó a valores a los que les corresponden unos valores D_{pH} ni excesivamente cortos ni largos para que el manejo de las muestras fuera cómodo, sin premuras ni excesos de tiempo.

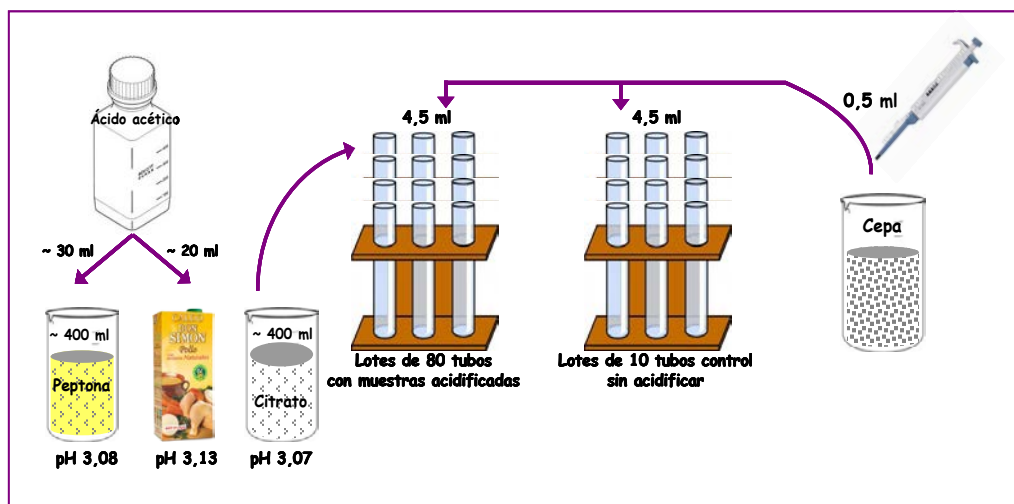


Figura 19. Método utilizado para estudiar la variabilidad de la inactivación microbiana mediante acidificación.

Tras la reactivación de la cepa siguiendo el protocolo del apartado 3.5.1, se inoculan 0,5 ml de una concentración aproximada de 10^6 ufc/ml del microorganismo en estudio en cada tubo de cada lote y se mantienen al pH que le correspondía en cada experiencia durante los tiempos necesarios para lograr de 0 a 4 reducciones logarítmicas de acuerdo con las predicciones de valores D_{pH} y z_{pH} obtenidos previamente. Esta metodología se esquematiza gráficamente en la Figura 19. Se tuvo siempre la precaución de inocular los microorganismos en los tubos en un orden preestablecido para posteriormente tomar las muestras en ese mismo orden.

Transcurridos los tiempos prefijados se toman 100 μ l de cada tubo y se depositan en un eppendorf con 900 μ l de tampón fosfato estéril 0,2 N a pH 7,0 con el fin de frenar el tratamiento acidificante. El orden en que se pipetea las alícuotas de los tubos es el mismo en el que se inoculan, con la precaución de tardar el mismo tiempo en la inoculación que en la posterior recogida de las alícuotas, para que todas las muestras del mismo lote reciban el mismo tratamiento acidificante. Con objeto de mantener las condiciones de esterilidad todas estas operaciones se desarrollan en la proximidad de un mechero Bunsen.

Concluida la etapa de la toma de muestras y su mezcla con tampón fosfato 0,2 N a pH 7,0 se obtiene la dilución 10^{-1} . A partir de ésta se preparan otras dos diluciones sucesivas que se siembran en placas de TSA con ayuda del equipo de siembra en espiral.

Una vez realizada la siembra, se procede a la incubación de las placas en las condiciones óptimas de crecimiento para cada microorganismo en estudio (Fig.20).

Finalizada la incubación, el recuento de los supervivientes se llevó a cabo en el analizador de imagen IUL Instruments, modelo Counter Flash. Los resultados se expresaron como la media de los recuentos obtenidos con las distintas diluciones sembradas por duplicado. En dicho contador automático los recuentos se obtienen multiplicando el número de colonias presentes en un área específica de la placa por un factor designado para cada área en particular. Teniendo en cuenta la dilución sembrada, el equipo calcula el número correspondiente de unidades formadoras de colonias por mililitro de muestra, la Figura 22 resume el protocolo seguido para el estudio de la variabilidad de la inactivación microbiana mediante acidificación. Los datos se procesaron en hojas Excel y se ajustaron a distribuciones normales con ayuda del programa VariFit.

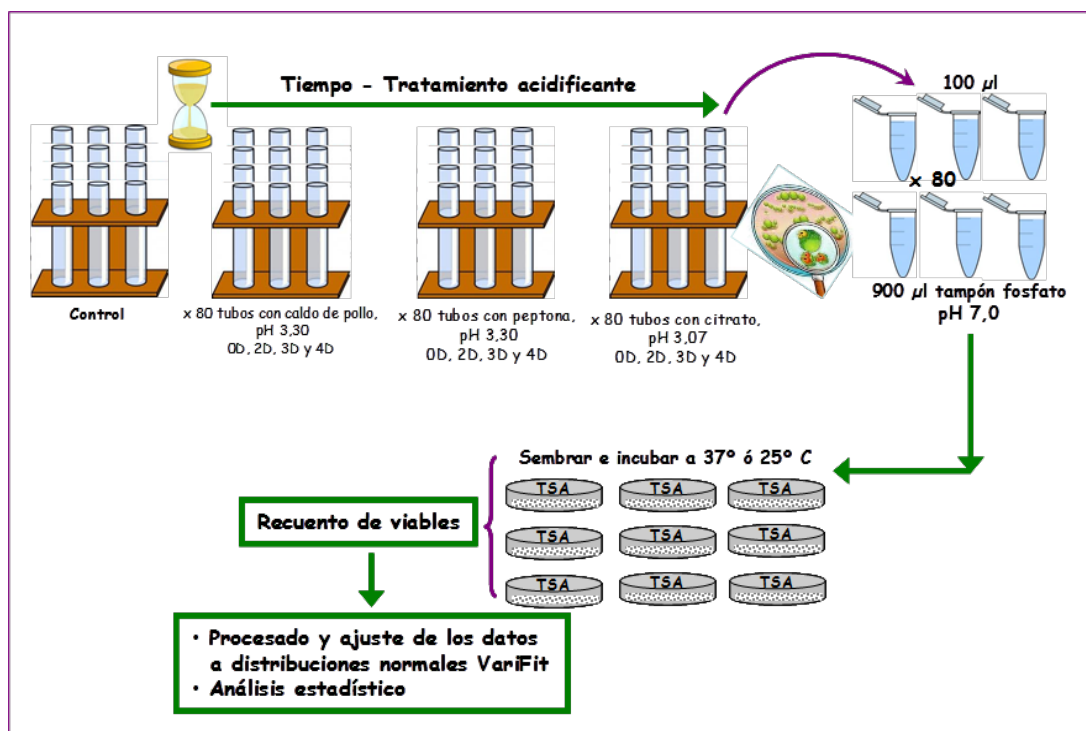


Figura 20. Tratamiento acidificante, toma de muestras y recuento de viables para analizar la variabilidad de la inactivación microbiana mediante acidificación.

3.8.1.1 Distribución normal

La distribución normal se utiliza con frecuencia en aplicaciones estadísticas y se define como la distribución de una variable aleatoria continua (número infinito de valores dentro de un determinado intervalo) que dependerá de la función de densidad de probabilidad $f(x)$, caracterizada por dos parámetros: su media (μ) y su desviación típica estándar (σ). La probabilidad de que una variable aleatoria x tome un valor determinado entre dos números reales **a** y **b** coincide con el área encerrada por $f(x)$ entre los puntos **a** y **b**, dada por la siguiente ecuación (Spiegel, 1995):

$$f(x) = \frac{1}{\sigma\sqrt{2\pi}} \exp\left\{-\frac{1}{2} \left[\frac{x-\mu}{\sigma}\right]^2\right\}; \quad -\infty < x < \infty \quad (26)$$

Mediante la aplicación del programa VariFit acoplado a Excel (programa donado por el Institute of Food Research Norwich, UK), los valores de los recuentos de los supervivientes a tratamientos de inactivación (0D, 2D, 3D y 4D) del apartado 3.8.1 fueron ajustados a una distribución normal.

La Figura 21 muestra un ejemplo de unas distribuciones obtenidas y su ajuste con el programa VariFit, que corresponde a *Salmonella* Enteritidis supervivientes a un proceso de acidificación en caldo de pollo a pH 3,40 durante 105 minutos (valor $D_{pH\ 3,40} = 36$ min.) para una inactivación esperada de 3 ciclos logarítmicos. La curva normal es asintótica al eje abscisas. Por ello cualquier valor entre $-\infty$ y $+\infty$ es teóricamente posible (el área total bajo la curva es por tanto igual a 1). La forma de la campana depende de los parámetros μ y σ .

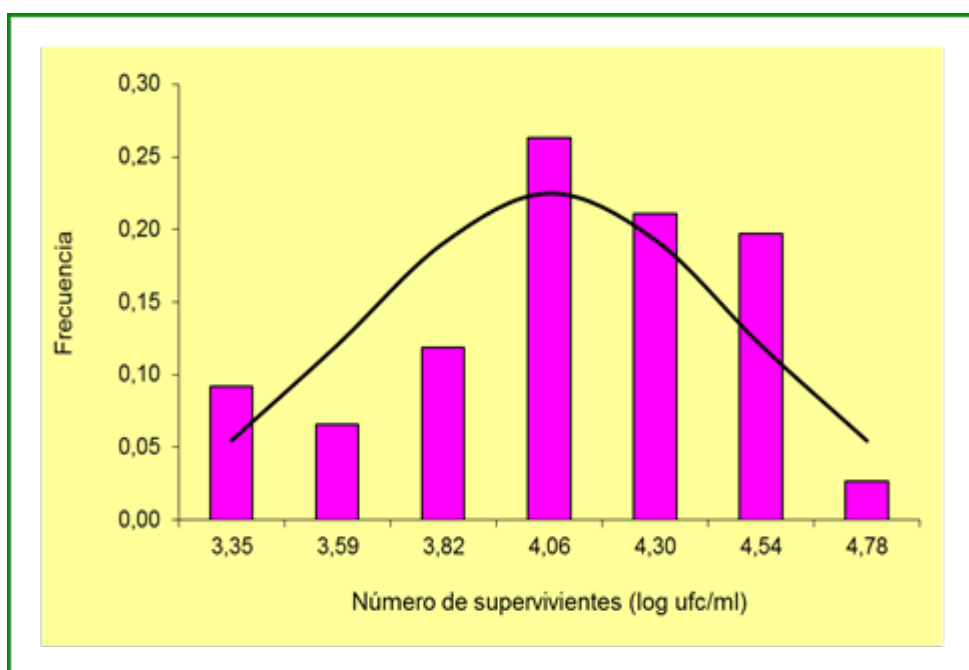


Figura 21. Ejemplo de distribución normal de *S. Enteritidis* supervivientes a un tratamiento que, teóricamente, reduce la carga micribiana 4 ciclos logarítmicos en caldo de pollo/ácido acético, valor $D_{pH\ 3,40} = 35$ minutos. Distribución obtenida de la Figura 33.

A manera de resumen la Figura 22 muestra el protocolo seguido durante los diferentes procesos de inactivación a tratamientos acidificantes

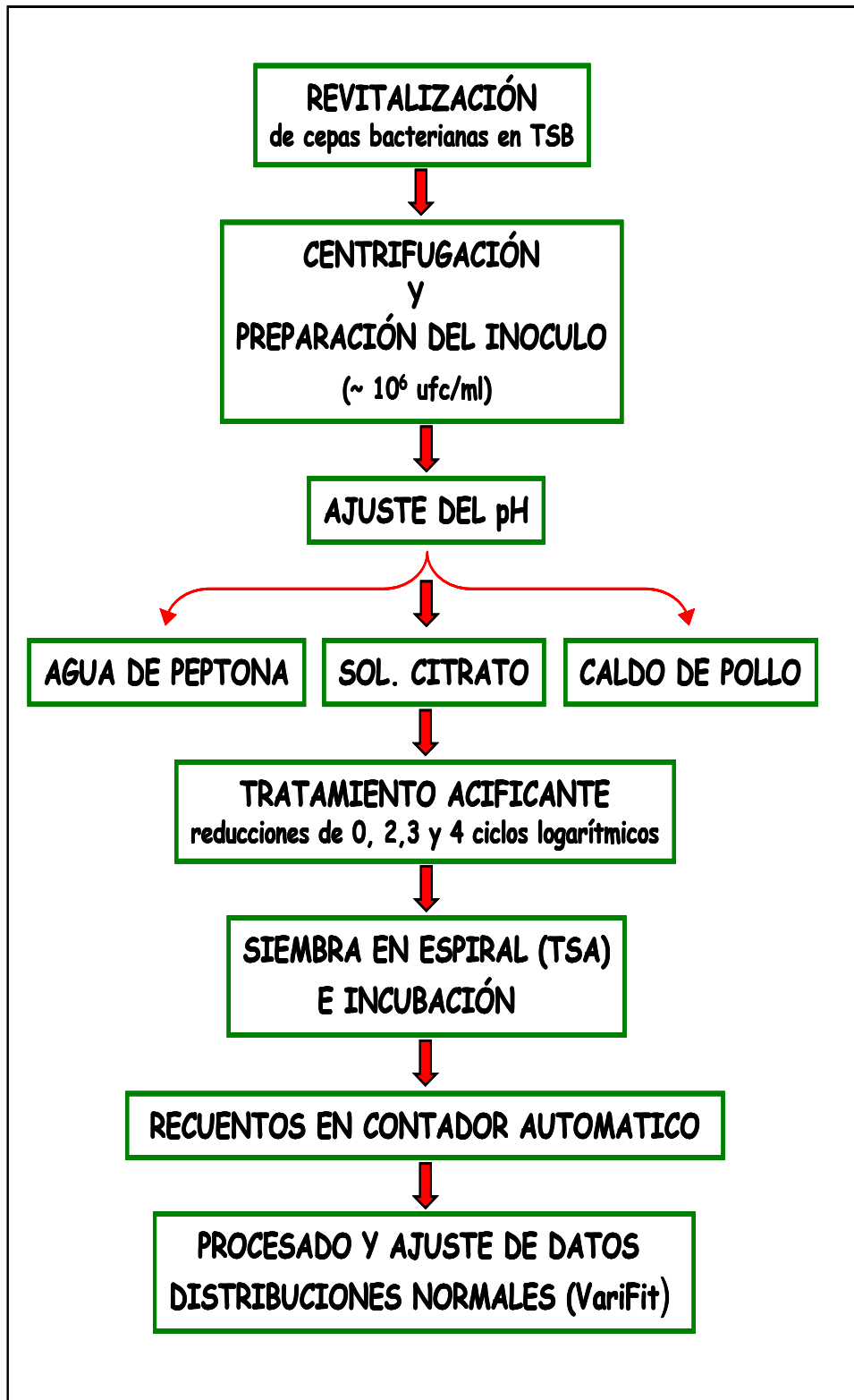


Figura 22. Esquema del protocolo para el estudio de la variabilidad de la inactivación microbiana mediante un proceso acidificante.

3.8.2 Inactivación en TSB/ HCl (0,5 N) y dilución de células supervivientes

Tras revitalizar los microorganismos (véase 3.7.1.1), se hacen pases a tubos con TSB estériles a pH 7 y 5 se incuban hasta alcanzar una carga estimada de 10^8 ufc/ml, se realizan cuatro diluciones decimales en solución salina al 0,80% hasta lograr la concentración microbiana de 10^4 ufc/ml. De esta dilución se añaden 10 ml a 90 de agua de peptona estéril a $\text{pH} \geq 3,0$ pero $\leq 3,9$; donde se mantienen tiempos suficientes para lograr una inactivación de 2, 3 y 4 ciclos logarítmicos (procedimiento seguido tanto para muestras a pH 7 y 5). Pasados los tiempos de inactivación se toma una muestra de 10 ml que se mezcla con 90 ml de tampón fosfato 0,2 N estéril a pH 7,0 con el fin de detener el tratamiento acidificante y microbicida. Se sigue el mismo protocolo para los controles, excepto que no se aplica tratamiento microbicida alguno. A continuación la suspensión bacteriana en tampón fosfato 0,2 N se diluye 4 veces consecutivas en TSB estéril a pH 7 ó pH 5, con objeto de conseguir células individuales; para ello, al vaso **A** se añade 10 ml del tampón fosfato 0,2 N con las bacterias supervivientes, y se mezclan homogéneamente con 90 ml de TSB. De aquí se transfieren 50 ml al vaso **B** que contiene 50 ml de TSB (pH 7 ó 5) y así sucesivamente hasta el vaso **D**, como se esquematiza en la Figura 23.

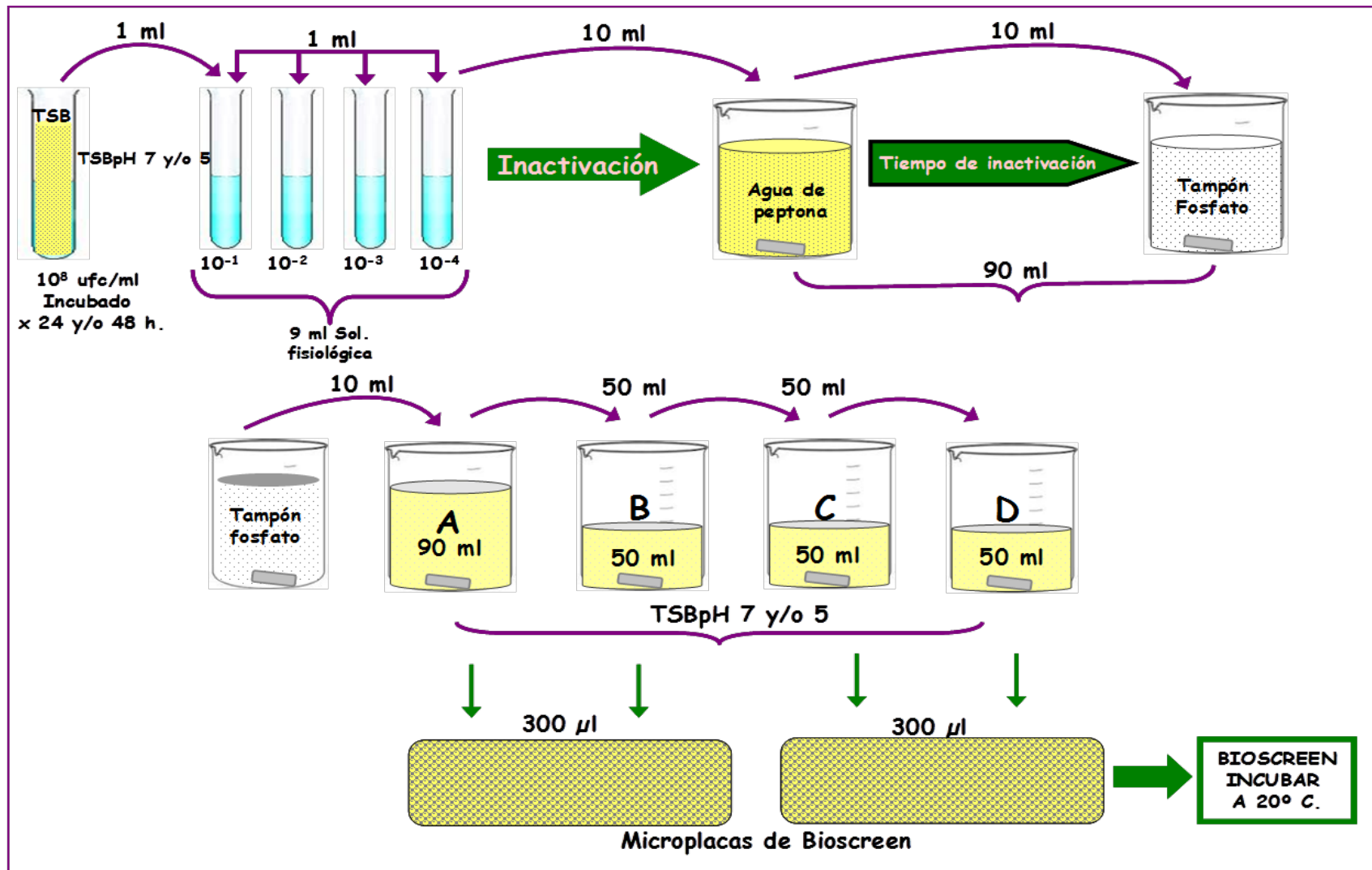


Figura 23. Tratamientos microbicidas de los microorganismos en estudio e individualización de las células supervivientes.

Posteriormente, de cada vaso (A, B, C y D), se transfieren, correctamente homogeneizados, 300 μ l a 50 pocillos del Bioscreen. Seguidamente, las dos microplacas del Bioscreen se incuban a 20°C y las absorbancias se registran cada 15 ó 30 minutos, dependiendo de la velocidad de crecimiento del microorganismo, hasta que las muestras sobrepasan una absorbancia de 0,25.

Para determinar el número medio de células depositado en cada pocillo, para cada dilución, se siembran 300 μ l de cada una de ellas en 15 placas de TSA estéril en profundidad. Una vez solidificado el TSA se incuban a las temperaturas óptimas de cada microorganismo. Los recuentos se realizan con ayuda de un contador de colonias manual (marca J.P. Selecta S.A.). Si el número de células por pocillo (en 300 μ l) no era lo suficientemente bajo en alguna de las diluciones (en torno a 1 célula por pocillo), la experiencia debía repetirse.

De esta manera se consigue una distribución de tiempos de detección de las células individualizadas después del tratamiento microbicida que es función de la fase de latencia, y que, matemáticamente, puede transformarse fácilmente en fases de latencia siempre que se conozca la μ_{max} en las condiciones del experimento. La fase de latencia es igual al tiempo de detección menos el tiempo invertido en que el inóculo inicial (teóricamente una única célula) llegue a la concentración microbiana que desarrolla una turbidez de 0,25. Esa cantidad se determinó previamente mediante las curvas de calibración (véase 3.7.1.3). El tiempo que gasta una célula en alcanzar una determinada concentración se calcula multiplicando el tiempo de generación por el número de generaciones necesarias para llegar a la concentración microbiana que genera la turbidez de 0,25 unidades. El tiempo de generación es igual al cociente entre el logaritmo de 2, porque se refiere al tiempo que tarda la población en multiplicarse por 2 o lo que es lo mismo $\log(2T/T)$, y la μ_{max} . Entonces, si esta tasa se ha calculado a partir de logaritmos naturales, el tiempo de generación o valor g se calcula:

$$\text{Valor g} = 0.693 / \mu_{max} \quad (27)$$

3.8.2.1 Distribución gamma

En estadística la distribución gamma es una distribución de probabilidad continua con dos parámetros β (forma) y λ (tasa) cuya función de densidad para valores de $x > 0$ es:

$$f(x) = \frac{\lambda e^{-\lambda x} (\lambda x)^{k-1}}{\Gamma(k)} \quad (28)$$

Siendo Γ la función gamma, que cuando β es un número entero y positivo es igual al factorial de $\beta-1$.

De las diversas funciones matemáticas, la que mejor refleja la realidad biológica de la fase de latencia del crecimiento microbiano es la distribución gamma (Métris, 2003; Métris y col., 2003; Métris y col., 2004; Elfving y col., 2004; Pin, 2004).

La forma y la tasa (shape y rate en inglés) dan una idea de la variabilidad de los datos utilizados en la generación de las distribuciones. La forma refleja el aspecto de la curva. Así, cuando la forma es menor de 1, la curva se asemeja a una exponencial decreciente, mientras que, para valores por encima de 1, la curva presenta un máximo, que coincide con la moda o valor más probable. Por otra parte, la escala da una idea de la altura de la distribución. Así, para una forma constante, cuanto mayor sea la escala, más alta y estrecha será la distribución de frecuencias, es decir, menos variable será el parámetro medido. Para una escala constante, cuanto mayor sea la forma, por encima de 1, mayor será la variabilidad, es decir, más anchas serán las distribuciones de frecuencia.

La varianza de los datos puede calcularse a partir de la forma y la escala mediante la siguiente expresión:

$$\text{Varianza} = \text{Forma} / (\text{Tasa})^2 \quad (29)$$

Lo que ayuda a interpretar la variabilidad de los resultados obtenidos. Cuanto mayor es la forma y menor la tasa (la altura de la curva) más dispersión presentarán los datos. A su vez, la media puede expresarse:

$$\text{Media} = \text{Forma} * \text{Tasa} \quad (30)$$

Para calcular la tasa y la escala se recurre a las siguientes ecuaciones:

$$\text{Tasa} = \text{Media} / \text{Varianza} \quad (31)$$

$$\text{Forma} = \text{Tasa} * \text{Media} \quad (32)$$

Por regla general no suele utilizarse la tasa sino su inversa, denominada escala, ya que teóricamente, tiene una interpretación biológica junto con la forma. El parámetro “forma” viene a representar la cantidad de trabajo a realizar durante la fase de latencia y el de “escala” da una idea de la velocidad a la que se realiza ese trabajo. En la Figura 24 se muestra un ejemplo, en el que se aprecia la distribución de frecuencias de la fase de latencia de células individuales de *S. Enteritidis* tras haber recibido un tratamiento de inactivante de 3,2 ciclos logarítmicos (valor teórico 3D), incubado en TSB a pH ~5,24. Esta distribución se caracteriza por una escala ó tasa de 0,2 y una forma de 4,0 cuando corresponde a una célula (1C) (valores mostrados en la Tabla 22).

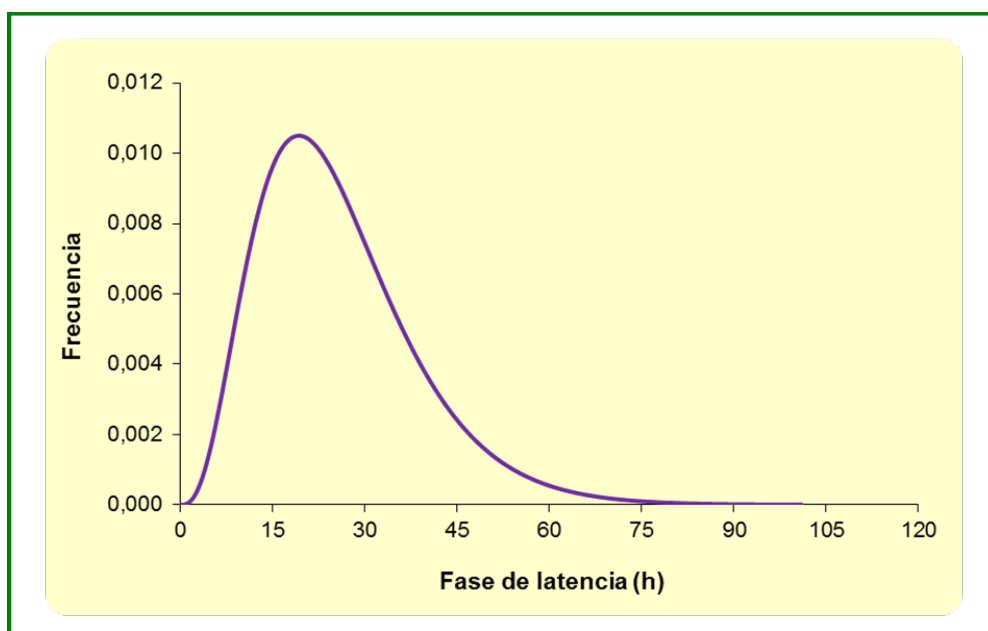


Figura 24. Distribución de frecuencia de la fase de latencia de *S. Enteritidis*, a pH ~5,24 en TSB a 20°C, supervivientes a un tratamiento que redujo la población en 3,2 ciclos logarítmicos. Esta distribución corresponde al número medio de células por muestra de 0,9 de la Tabla 19.

3.8.2.2 Cálculo del tamaño del inóculo

En este trabajo se intenta determinar la fase de latencia de células individualizadas, pero no es fácil garantizar que en una muestra solo existe realmente 1 microorganismo viable. El protocolo de aislamiento de células individuales mediante diluciones ya se ha descrito en la Figura 23.

El sistema habitual de determinar la fase de latencia de células individualizadas seguido por muchos investigadores es un método rápido, no destructivo y relativamente económico que monitoriza el crecimiento de cultivos microbianos (Bajaj y col., 1991; Baumgart, 1992). Esta técnica ha ganado precisión gracias a los equipos turbidimétricos automatizados (Bioscreen C), que permite sembrar el mismo inóculo en los 100 pocillos del Bioscreen y comprobar que solo se aprecia crecimiento en un determinado número de pocillos. Como las muestras se toman de la misma suspensión, al apreciarse crecimiento en unos pocillos y en otros no, muchos autores (Francois y col., 2005b; D'Arrigo y col., 2006; Guillier & Augustin, 2006) han supuesto que en los que se detecta crecimiento puede existir una sola célula. No obstante, para afinar más en la estimación del número de células en cada pocillo y así calcular con mayor precisión la fase de latencia de células individuales, varios autores consideran como método alternativo la distribución de frecuencias de la función de Poisson (Aguirre, 2012), la cual indica que un cierto número de muestras contendrán uno, dos, tres o más células viables, en función del porcentaje de muestras que presenten crecimiento, como se muestra en las Tabla de Poisson (Tabla 4). Esta Tabla, además, te ofrece el número medio de célula (m) por muestra, siempre en función del % de pocillos con crecimiento.

Así, de acuerdo con la distribución de Poisson, se asume que el número de células (N) por pocillo sigue esta distribución con un parámetro m , el número medio de células por pocillo (m) que puede calcularse mediante la siguiente fórmula:

$$p_0 = e^{-m} \quad (33)$$

Donde p_0 representa la probabilidad de que en un pocillo no se produzca crecimiento, teóricamente porque no hay ninguna bacteria en ese pocillo (se asume que siempre que hay un microorganismo, éste crecerá). Entonces:

$$m = -\ln(p_0) \quad (34)$$

En la Tabla 4 se muestra la cantidad más probable de microorganismos por pocillo asociada a la probabilidad de que en él no se produzca crecimiento. Si se observase crecimiento en todos los pocillos, para calcular el inóculo inicial puede determinarse la carga de cada uno mediante la técnica del número más probable. Así, si se observa crecimiento en 20 pocillo de 100, la predicción es que el número medio de células por pocillo es de 0,223, por lo que existirán 22 células distribuidas en los 100 pocillos, o lo que es lo mismo, es de esperar que haya un par de pocillos con 2 células y en otros 18 solo una célula. Los investigadores desprecian ese pequeño error y consideran que en los 20 pocillos donde ha habido crecimiento, existe una sola célula.

Tabla 4.

Número medio (m) de células en un pocillo asociado a la probabilidad (p_0) de que en él no se produzca crecimiento.

P_0	m	p_0	m	P_0	m	P_0	m	p_0	M
0'99	0'010	0'79	0'236	0'59	0'528	0'39	0'942	0'19	1'661
0'98	0'020	0'78	0'248	0'58	0'545	0'38	0'968	0'18	1'715
0'97	0'030	0'77	0'261	0'57	0'562	0'37	0'994	0'17	1'772
0'96	0'041	0'76	0'274	0'56	0'580	0'36	1'022	0'16	1'833
0'95	0'051	0'75	0'288	0'55	0'598	0'35	1'050	0'15	1'897
0'94	0'062	0'74	0'301	0'54	0'616	0'34	1'079	0'14	1'966
0'93	0'073	0'73	0'315	0'53	0'635	0'33	1'109	0'13	2'040
0'92	0'083	0'72	0'329	0'52	0'654	0'32	1'139	0'12	2'120
0'91	0'094	0'71	0'342	0'51	0'673	0'31	1'171	0'11	2'207
0'90	0'105	0'70	0'357	0'50	0'693	0'30	1'204	0'10	2'303
0'89	0'117	0'69	0'371	0'49	0'713	0'29	1'238	0'09	2'408
0'88	0'128	0'68	0'386	0'48	0'734	0'28	1'273	0'08	2'526
0'87	0'139	0'67	0'400	0'47	0'755	0'27	1'309	0'07	2'659
0'86	0'151	0'66	0'416	0'46	0'777	0'26	1'347	0'06	2'813
0'85	0'163	0'65	0'431	0'45	0'799	0'25	1'386	0'05	2'996
0'84	0'174	0'64	0'446	0'44	0'821	0'24	1'427	0'04	3'219
0'83	0'186	0'63	0'462	0'43	0'844	0'23	1'470	0'03	3'507
0'82	0'198	0'62	0'478	0'42	0'868	0'22	1'514	0'02	3'912
0'81	0'211	0'61	0'494	0'41	0'892	0'21	1'561	0'01	4'605
0'80	0'223	0'60	0'511	0'40	0'916	0'20	1'609		

Pero está demostrado que la duración de la fase de latencia es función, entre otros factores, del número de células que forman la población (Aguirre, 2012). Así, si hay dos, tres o n células viables, la fase de latencia de la población será paulatinamente más corta y, es de esperar, menos variable. Matemáticamente puede calcularse con la Ecuación (25) del apartado 3.7.4, siempre que previamente se conozca T_d , el tiempo de detección (el necesario para alcanzar 0,25 unidades de absorbancia a una longitud de onda de 420-580 nm), N_0 es la carga inicial de bacterias, N_d el número de bacterias que generaba esa absorbancia y μ_{max} , la tasa máxima de crecimiento. Los dos últimos parámetros se consideran constantes y muchos autores incluyen también en esa constancia N_0 , pero como se dispone de métodos estadísticos que permiten saber cuántas células existen por muestra, e incluso cómo se distribuyen esas células en las muestras, en esta Tesis se ha concebido calcular con mayor precisión el tamaño del inóculo y así llegar a determinar la fase de latencia de las muestras con mayor exactitud. Se han planteado tres estrategias para el cálculo del número de células en cada pocillo con la finalidad de analizarlas por separado y poder después compararlas. Las tres estrategias se basan en los siguientes supuestos:

1. Todas las muestras con crecimiento contenían una célula (1C), tal como preconizan Francois y col. (2005b), D'Arrigo y col. (2006) y Guillier & Augustin (2006), entre otros.
2. El tamaño del inóculo es la media de la distribución truncada de Poisson (PT) (Métris y col., 2006).
3. El número de células por muestra se estima utilizando la función de Poisson (P), considerando que las muestras que crecían antes contenían el mayor número de células, la siguiente muestra en crecer contenía el segundo número de células, y así sucesivamente, siempre de acuerdo con esa distribución (Aguirre, 2012).

El protocolo para la realización del estudio de la variabilidad de la fase de latencia de células supervivientes a tratamientos acidificantes se muestra en la Figura 25.

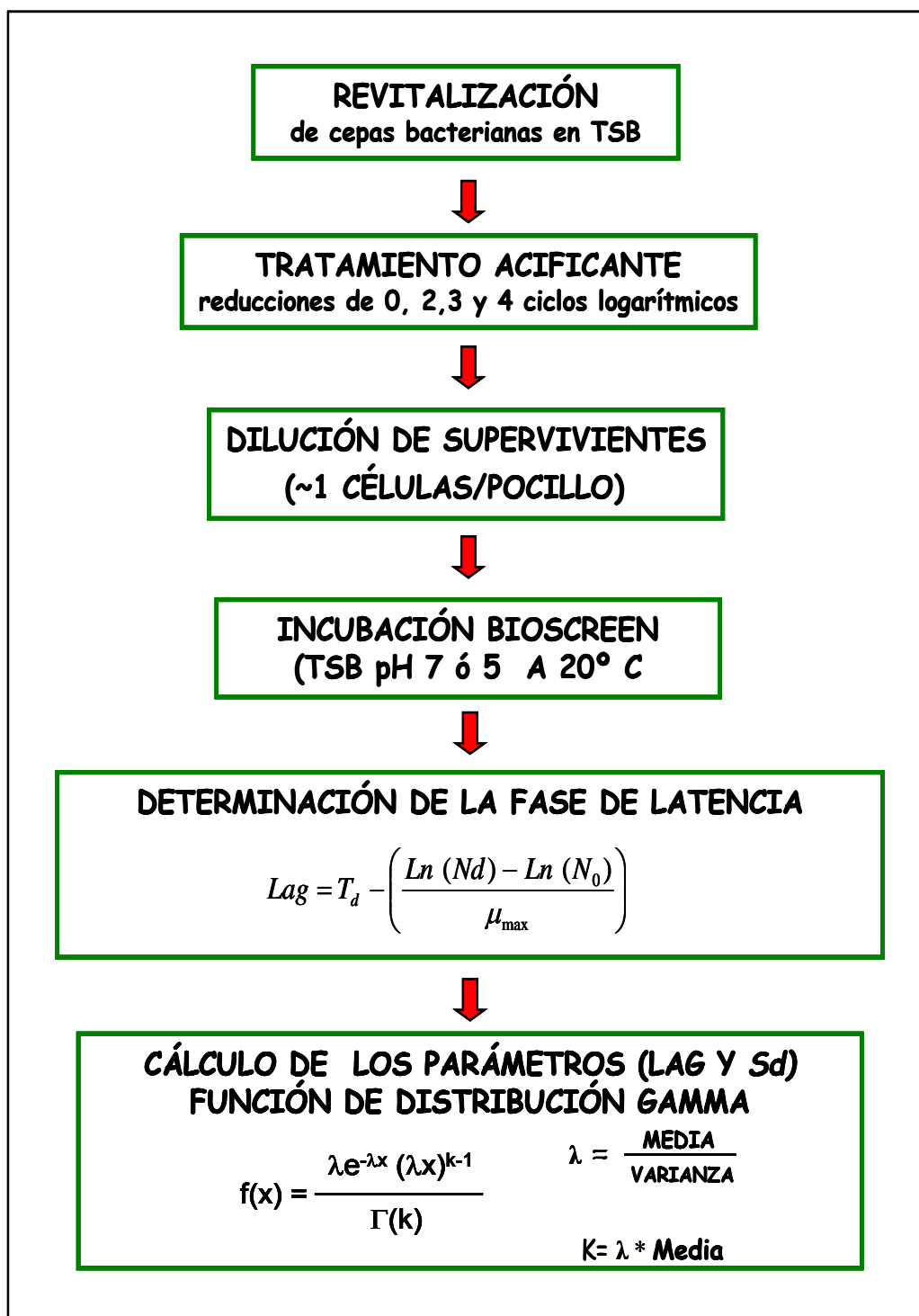


Figura25. Esquema del protocolo para estudiar la variabilidad de la fase de latencia de células supervivientes a tratamientos acidificantes.

3.9 ANÁLISIS DE DATOS

Las distribuciones de inactivación y de las fases de latencia se estudian estadísticamente obteniéndose los parámetros que caracterizan las distintas distribuciones (valores mínimos y máximo, media, desviación estándar y varianza, coeficiente de variación, etc.) con ayuda de una hoja de cálculo Excel.

Para la comparación de las distribuciones obtenidas tras diferentes tratamientos se utilizó la prueba de homogeneidad de varianzas mediante el test de Bartlett en el caso de la distribución del número de supervivientes, y el test de permutación para las distribuciones de la fase de latencia. Todos estos estudios matemáticos se analizan con macros VariFit (ajuste de distribuciones), DmFit 2.1 (curva de crecimiento), amablemente cedidas por sus programadores, el Dr. József Baranyi y su equipo del Institute of Food Research (UK), el programa Statgraphic Plus 5.0 (para el test de Bartlett que compara distribuciones normales), el software R 2.7.2. (para el test de permutación que compara distribuciones gamma) y el software EasyFit 5.5 (estudio del mejor ajuste).

4 RESULTADOS Y DISCUSIÓN

Duda siempre de ti mismo hasta que los datos no dejen lugar a duda (Luis Pasteur).

En este capítulo se exponen y discuten los datos obtenidos al tratar diferentes microorganismos (*Enterococcus faecalis*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas fluorescens* y *Salmonella* serovar Enteritidis) con distintos agentes acidificantes. Se ha determinado el número de supervivientes y su fase de latencia en diferentes condiciones. Los datos recabados se han analizado estadísticamente para determinar la variabilidad, tanto de la inactivación (número de supervivientes) como la de la fase de latencia de tales microorganismos, capaces de multiplicarse tras la acidificación, con el fin último de aportar datos para una estimación cuantitativa basada en un conocimiento científico, de la vida útil de los alimentos en los que haya podido producirse una acidificación. El protocolo seguido en estos estudios se ha descrito en el capítulo de Material y Métodos.

Son muchos los estudios en que se analiza el efecto de los ácidos orgánicos en la viabilidad microbiana (Ahamad y Marth, 1989; Young y Foegeding, 1993; Giannuzzi y Zaritzky, 1996; Phan-Thanh y col., 2000; dos Santos, 2007; Álvarez, 2009). Los datos aportados por estos estudios acerca de la inclusión de una bacteria en un ambiente ácido indican que, dependiendo del ácido que se trate y del pH, habrá una proporción más o menos elevada de ácido sin disociar que pueda penetrar en las células, disociarse en su interior, y producir daños más o menos graves, que puedan conllevar la inactivación o no. Cuando solo se producen daños y la célula mantiene cierto grado de viabilidad, estos daños han de repararse antes de que la célula pueda llegar a multiplicarse. Es decir, la célula tendrá una más o menos larga fase de latencia en función de los daños que tenga que reparar, sin considerar las condiciones que pueda encontrarse en su entorno, temperatura, nuevo pH, etc.

En este estudio se analizarán tanto la inactivación -mediante acidificación- como la fase de latencia de las células que sobreviven a un tratamiento acidificante. Se ha trabajado con microorganismos representativos y significativos en Microbiología de los Alimentos, como son *Enterococcus faecalis*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas fluorescens* y *Salmonella* serovar Enteritidis.

4.1 ESTIMACIÓN DE LOS PARÁMETROS CINÉTICOS DE INACTIVACIÓN MICROBIANA A TRATAMIENTOS SUBLETALES (VALORES D_{pH} y z_{pH})

Los valores D_{pH} y z_{pH} se calcularon de acuerdo con los expuesto en el apartado 3.6.3.

El microorganismo en estudio se trataba a un determinado pH en uno de los medios analizados, se recontaban los supervivientes (N) en TSA cada cierto tiempo (minutos) los datos obtenidos se graficaban con ayuda de Microsoft Excel, en términos de $\log_{10} N$ y el tiempo de exposición al tratamiento, y dado que las nubes de puntos obtenidos en casi todos los casos obedecían a una cinética de inactivación de primer orden, se ajustaron a una recta de regresión, y, finalmente, el valor inverso de la pendiente de dicha recta, en valor absoluto, fue el valor D_{pH} para esa determinada condición (Ecuación 19). Los datos y las rectas correspondientes se muestran en las Figuras 26 (*Enterococcus faecalis*), 27 (*Listeria innocua*), 28 (*Pseudomonas fluorescens*) y 29 (*Salmonella* serovar Enteritidis).

Las rectas de regresión de las nubes de puntos de las representaciones gráficas del logaritmo de microorganismos supervivientes a un pH determinado frente al tiempo, muestran que las pendientes, como no podía ser de otra manera, son negativas (Figs. 26, 27, 28 y 29), observándose que a medida que disminuye el pH, disminuye la pendiente de la curva de supervivencia. Es decir, a medida que se hace más ácido, la inactivación tiene lugar con una rapidez cada vez mayor.

Las nubes de puntos obtenidas, en algún caso podría haberse ajustado a otras funciones que hubieran dado unos coeficientes de correlación más altos, pero considerando que una mayoría de datos se ajustaban bien a la linealidad recta y que los cálculos son más sencillo e intuitivos con este ajuste, se optó por homogeneizar todos ellos a una recta de regresión, sinónimo de una inactivación de primer orden.

A partir de los valores D_{pH} calculados, se determinó el otro parámetro crítico para el análisis de la inactivación microbiana, el valor z_{pH} , también con ayuda de Microsoft Excel. La representación gráfica de los $\log_{10} D_{pH}$ frente al pH, que es lineal, permite calcularlo; el valor absoluto de la pendiente de dicha recta de regresión (Ecuación 21) coincide con las unidades de pH que debe modificarse el medio para incrementar o disminuir 10 veces la inactivación microbiana (valor z_{pH}) en el intervalo de pHs analizados. La Figura 30 ilustra estos cálculos y a partir de estas Figuras puede predecirse el efecto de cualquier pH en la inactivación microbiana, siempre que su valor se encuentre dentro del intervalo analizado. Este hecho es relevante en esta Tesis, ya que, como se verá más adelante, se compararon efectos microbicidas similares sobre los

diferentes microorganismos y en distintos sustratos para llevar a cabo el análisis de la variabilidad y cómo podían influir estas variables en ella.

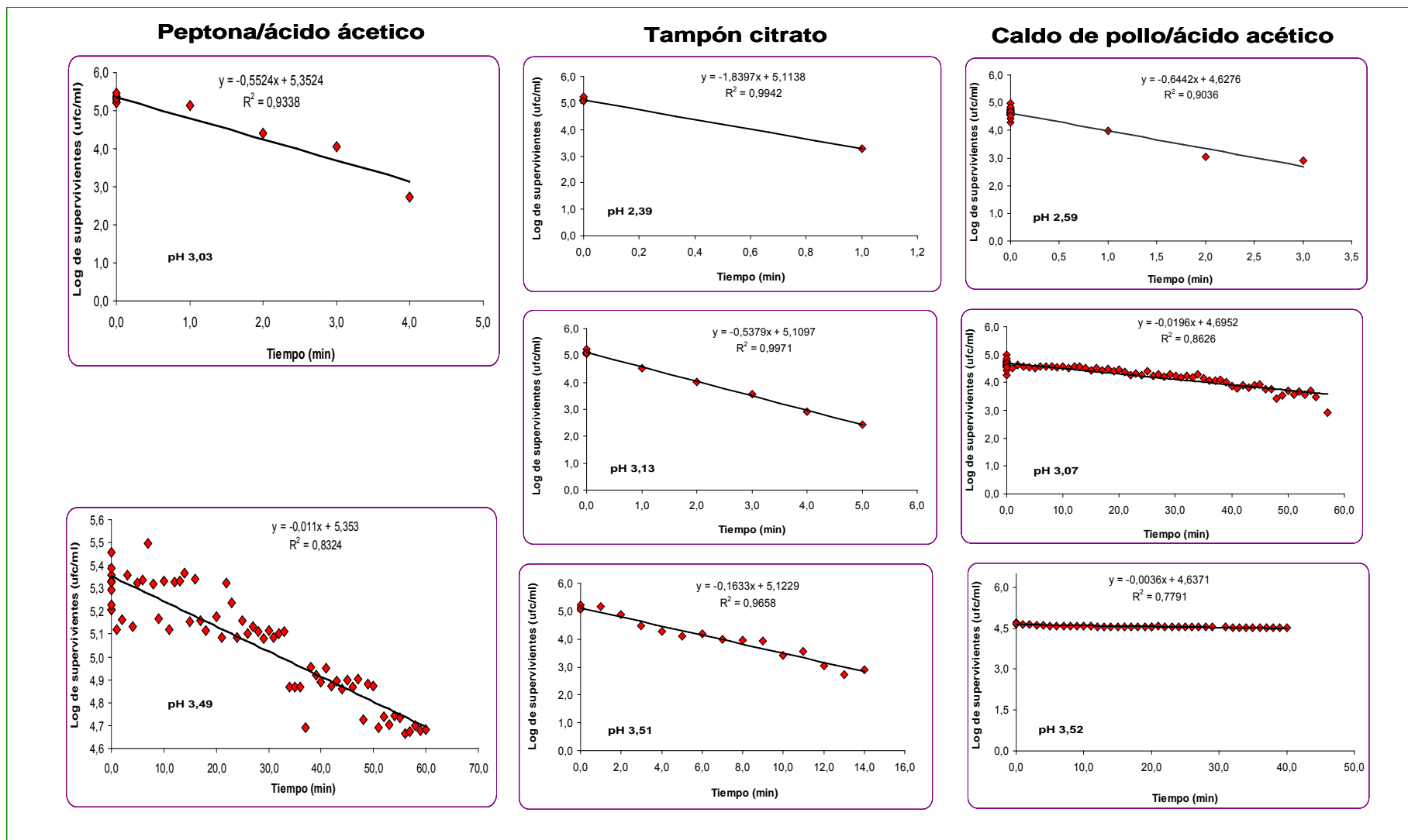


Figura 26. Representaciones gráficas de los valores *DpH* de *Enterococcus faecalis* en agua de peptona/ácido acético, tampón citrato y caldo de pollo/ácido acético.

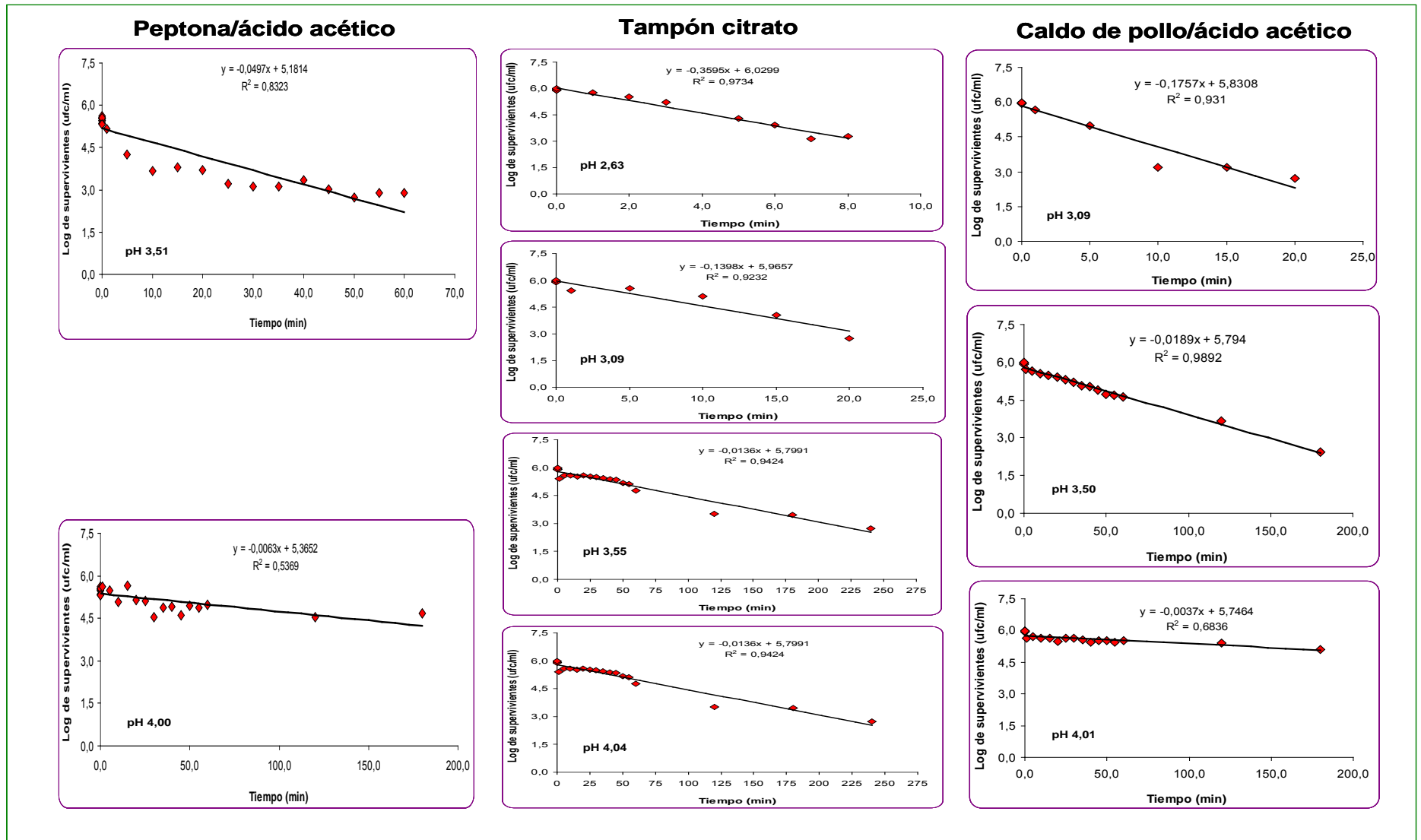


Figura 27. Representaciones gráficas de los valores D_{pH} de *Listeria innocua* en agua de peptona/ácido acético, tampón citrato y caldo de pollo/ácido acético.

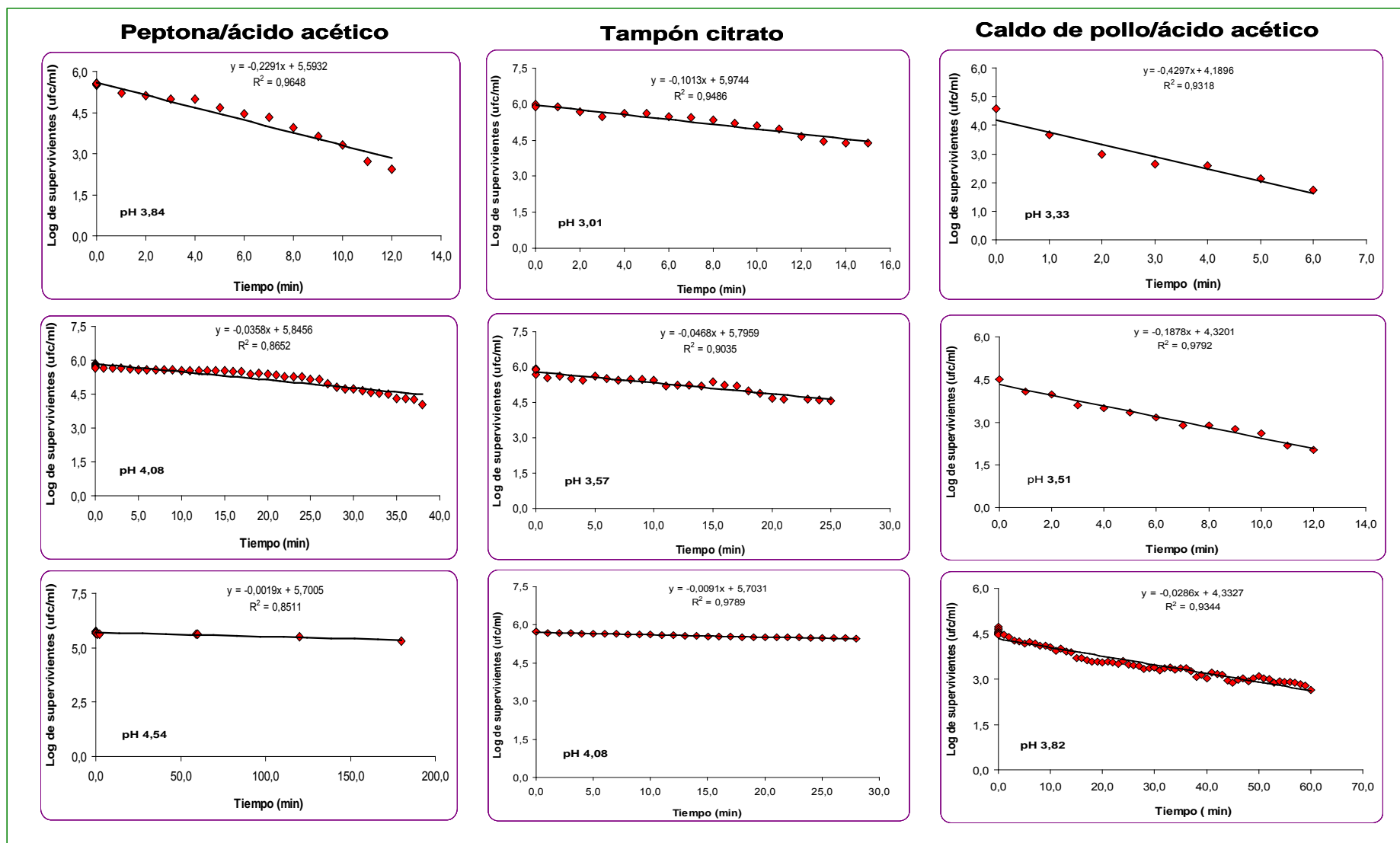


Figura 28. Representaciones gráficas de los valores D_{pH} de *Pseudomonas fluorescens* en agua de peptona/ácido acético, tampón citrato y caldo de pollo/ácido acético.

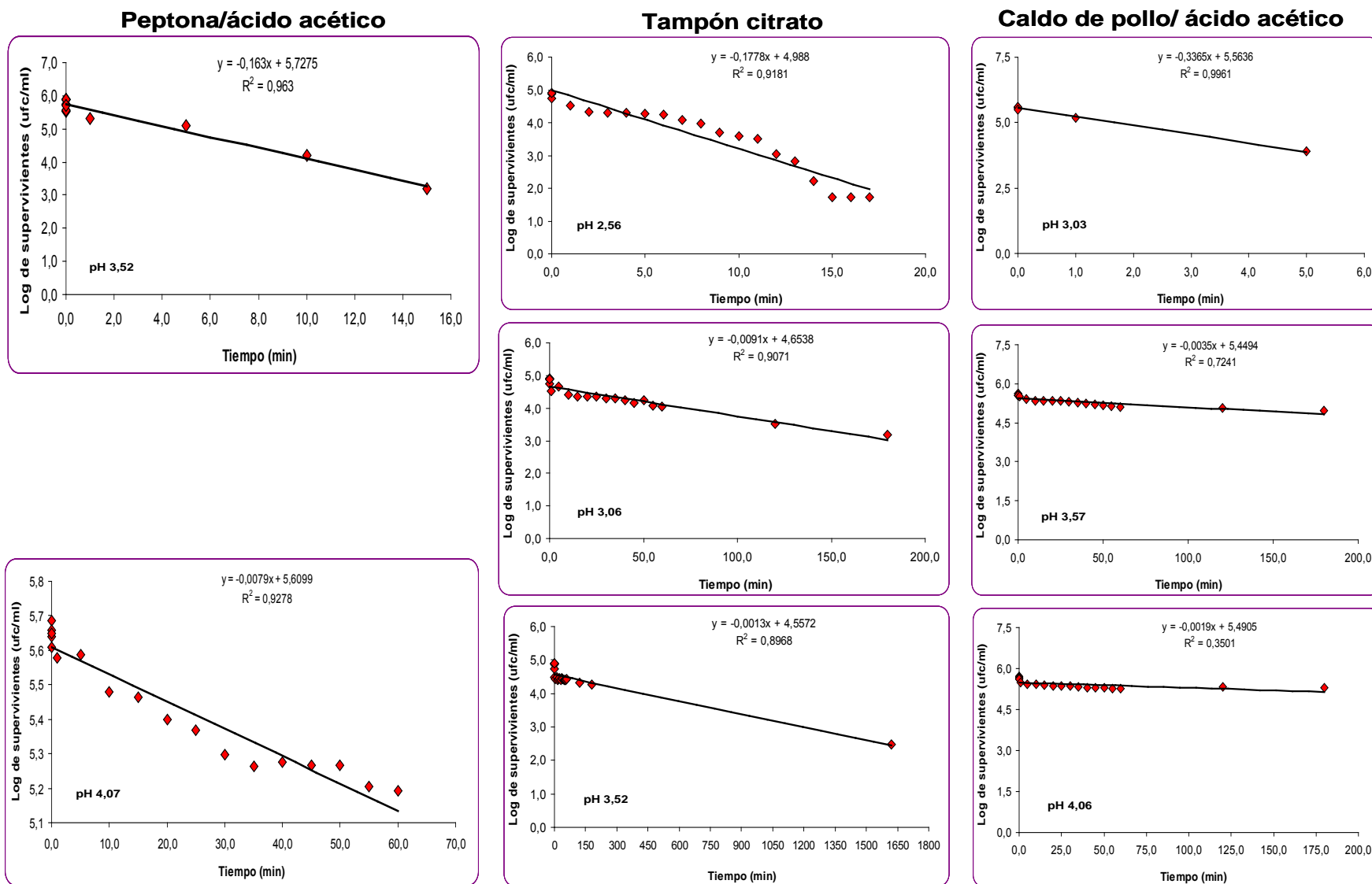


Figura 29. Representaciones gráficas de los valores D_{pH} de *Salmonella* serovar Enteritidis en agua de peptona/ácido acético, tampón citrato y caldo de pollo/ácido acético.

Cabe destacar las diferencias entre el efecto del tampón citrato y los otros medios acidificantes (a base de ácido acético). El citrato tiene un efecto microbicida menor como puede observarse en las pendientes de las Figuras 26-29.

Es sabido que la resistencia de los microorganismos a los ácidos orgánicos o a la acidez es muy variable. Parece que las levaduras y los mohos son algo más tolerantes que las bacterias y dentro de éstas suele admitirse que las Gram-negativas son algo más resistentes que las Gram-positivas (Russell, 1991), probablemente debido a su membrana externa (Nikaido y Vaara, 1985). También existen diferencias en función de la especie y el estado de la célula, siendo las formas vegetativas más sensibles que las esporas (Heinzel, 1998), al igual que las células jóvenes (fase exponencial) son menos resistentes que las células maduras (fase estacionaria) (Kolter y col., 1993). Estas asunciones generalistas han tenido un reflejo variado en los datos obtenidos en esta Tesis. Cuando el ácido utilizado fue el acético, el microorganismo más resistente fue *E. faecalis*, seguido de *L. innocua*, después *S. Enteritidis*, siendo el más sensible *P. fluorescens*, en cambio *S. Enteritidis* demostró una muy considerable resistencia al tampón citrato como lo demuestran sus valores $D_{pH\ 3,52}$ y $D_{pH\ 3,06}$, de más de 12 horas y casi 2 horas, respectivamente (Tabla 5). También fueron bastante tolerantes al ácido cítrico *L. innocua* y *P. fluorescens*, aunque sin llegar a las cifras del anterior, mientras que *E. faecalis* fue mucho más sensible, ofreciendo unos valores $D_{pH\ 3,51}$ y $D_{pH\ 3,13}$ de 6,12 y 1,86 minutos (véase Tabla 5). De estos resultados se deduce que la tolerancia a la acidez depende del ácido utilizado y de la propia naturaleza del microorganismo y que la generalización de que las bacterias Gram-negativas son más ácido resistentes que las positivas puede quedar en entredicho en muchos casos, como ha sucedido en esta Tesis. Es posible que las diferencias en la resistencia a la acidez entre las bacterias Gram-positivas y las Gram-negativas se deba a que las membranas de las células bacterianas no son simples estructuras impermeables, sino específicas y selectivas, y que pueden estar modificándose activamente como respuesta a cambios del medio externo (Adams y Moss, 1997; Brown y col., 1997). Estos resultados son coherentes con otros estudios de inactivación microbiana como por ejemplo las realizadas por Brown y col. (1997) en cinco cepas de *E. coli* (expuestas a pH 3,0). La ventajosa capacidad de adaptación a cambios ambientales de las células Gram-negativas demuestra que poseen una gran plasticidad fenotípica.

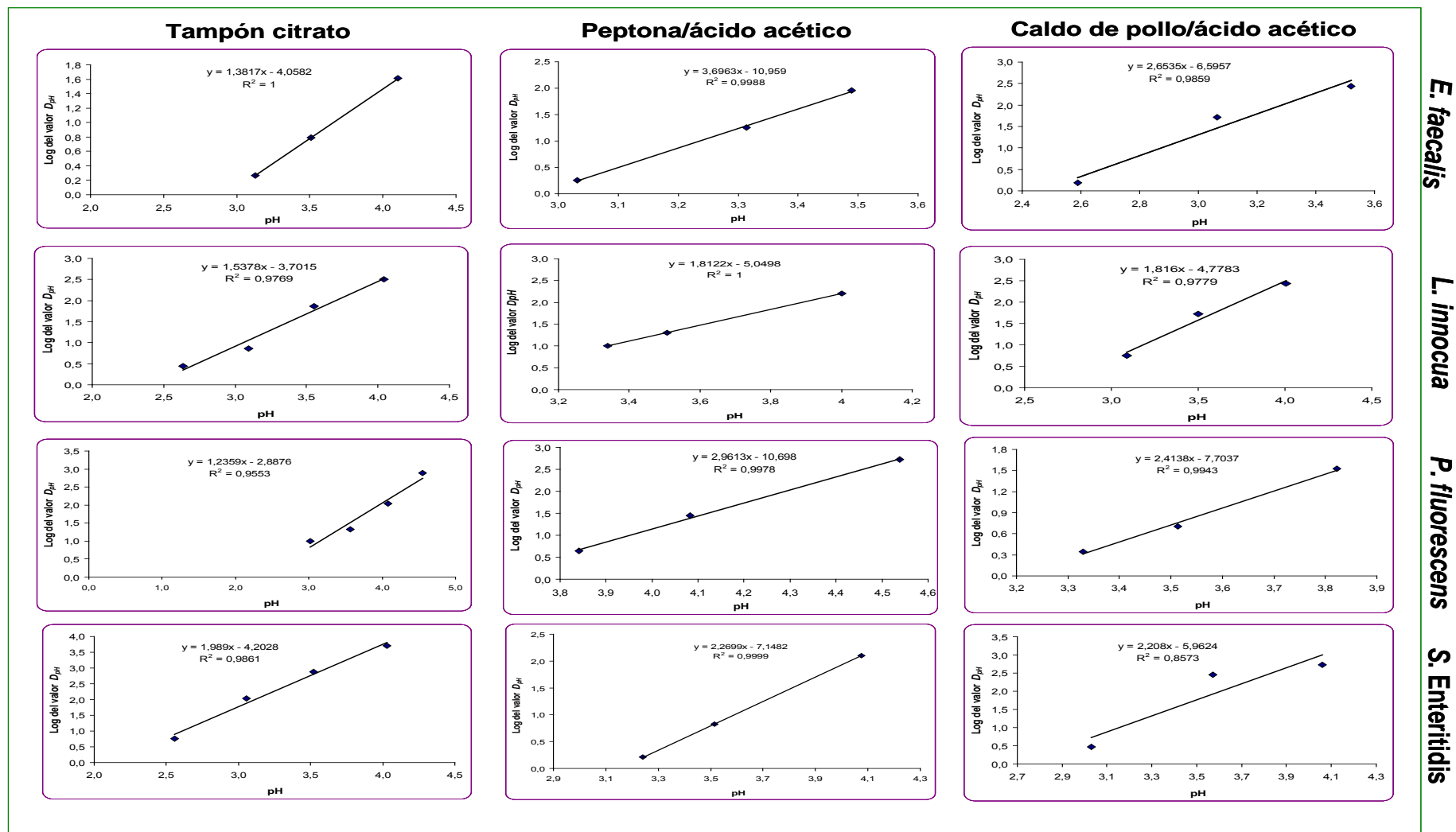


Figura 30. Valores z_{pH} de *Enterococcus faecalis*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas fluorescens* y *Salmonella* Enteritidis en tampón citrato, agua de peptona/ácido acético y caldo de pollo/ácido acético.

Por otra parte, la comparación entre los valores D_{pH} en peptona/ácido acético y caldo de pollo/ácido acético véase en la Tabla 5, permiten deducir que la compleja composición del alimento protege a las bacterias del efecto ácido. Mientras que fueron necesarios 51 minutos para reducir en un 90% población de *E. faecalis* en caldo de pollo a pH 3,07, se consiguió el mismo efecto en menos de 2 minutos en agua de peptona ajustada a pH 3,03. El mismo efecto se ha observado en los otros microorganismos, sobre todo en *S. Enteritidis*, cuyos valores $D_{pH\ 3,52}$ y $D_{pH\ 3,57}$ fueron 6,13 min (agua de peptona/ácido acético) y 285,7 min (caldo de pollo/ácido acético), respectivamente. El mismo efecto lo observaron Álvarez-Ordóñez y col. (2009) en *Salmonella typhimurium* en BHI y extracto de carne a pH 3'0, ajustados ambos con ácido acético, el tiempo de inactivación fue de 11,72 min y 89,54 min respectivamente. No obstante, las diferencias en el caso de *L. innocua* no fueron tan manifiestas. Sus valores $D_{pH\ 3,51}$ (agua de peptona/ácido acético) y $D_{pH\ 3,50}$ (caldo de pollo/ácido acético) fueron 20,1 y 52,9 minutos respectivamente. La mayor resistencia de los microorganismos en alimentos que en medios de laboratorio no solo se aprecia ante la acidez sino también ante otras operaciones de conservación o factores estresantes, como los tratamientos térmicos. Por ejemplo, valor $D_{59^{\circ}C}$ en solución salina fue de 7,81 min y $D_{59^{\circ}C}$ en leche entera de 34,84 min para *E. faecalis*, y para *L. innocua* inoculado en solución salina $D_{54^{\circ}C}$ 6,61 min y en leche entera $D_{54^{\circ}C}$ 13,7 min (Aguirre y col., 2009a).

A partir de estos datos, expuestos en la Tabla 5, es muy difícil predecir cómo va a comportarse un microorganismo ante la acidez en un determinado sustrato, por lo que será necesario analizar caso por caso, en condiciones reales, la resistencia del o los microorganismos diana para un determinado producto.

Comparar los datos aquí recabados con los obtenidos por otros autores no es tarea fácil, debido a que las condiciones experimentales, aunque similares, no son idénticas, apreciándose más o menos sutiles diferencias entre los componentes del sustrato, el tipo de ácido, la preparación del inóculo, incluyendo posibles adaptaciones previas, más o menos largas o repetitivas, a la acidez, y otros factores ambientales, además, claro está, del propio pH que, recuérdese, es una medida logarítmica, por lo que cada décima de más en el valor del pH implica prácticamente un 25% más de concentración de hidrogeniones, que pueden determinar variaciones en los datos. Por tanto, no es de extrañar que los resultados entre los diferentes autores puedan ser dispares como ya

apuntaron Foster y Hall (1990) y Bearson y col. (1997). Basta de muestra el D_{pH} obtenido por Buchanan y col. (1993), en BHI/ácido acético a pH 4,0 para *L. monocytogenes*, el tiempo de inactivación decimal fue de 0,9 min mientras que en este estudio, en agua de peptona/ácido acético a idéntico pH, el D_{pH} fue de casi 160 minutos, cuando, a priori, el cambio de BHI por peptona no parece predecir tales diferencias y siempre se ha considerado a *L. innocua* como un subrogado de *L. monocytogenes*, cuyo comportamiento, es de esperar y muy similar.

Tabla 5.

Valores D_{pH} y z_{pH} experimentalmente calculados para *Enterococcus faecalis*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas fluorescens* y *Salmonella* serovar Enteritidis.

Microorganismos	Sustratos	pHs	Valor D^a (min)	SE ^b	R ²	Valor z	SE	R ²
<i>E. faecalis</i>	Agua de peptona/ácido acético	3,03	1,81	0,0425	0,93	0,27	0,127	0,99
	Agua de peptona/ácido acético	3,49	90,90	0,0006	0,83			
	Caldo de pollo/ácido acético	2,59	1,55	0,0459	0,90	0,38	0,453	0,97
	Caldo de pollo/ácido acético	3,07	51,02	0,0009	0,86			
	Caldo de pollo/ácido acético	3,52	277,78	0,0003	0,78			
	Tampón citrato	3,13	1,86	0,0096	0,99	0,72	0,008	0,99
	Tampón citrato	3,51	6,12	0,0072	0,97			
<i>L. innocua</i>	Agua de peptona/ácido acético	3,51	20,12	0,0049	0,83	0,55	0,003	0,99
	Agua de peptona/ácido acético	4,00	158,73	0,0012	0,54			
	Caldo de pollo/ácido acético	3,09	5,69	0,0195	0,93	0,55	0,273	0,98
	Caldo de pollo/ácido acético	3,50	52,91	0,0005	0,99			
	Caldo de pollo/ácido acético	4,01	270,27	0,0006	0,68			
	Tampón citrato	2,63	2,78	0,0198	0,97	0,65	0,167	0,98
	Tampón citrato	3,09	7,15	0,0152	0,92			
	Tampón citrato	3,55	73,53	0,0008	0,94			
<i>P. fluorescens</i>	Tampón citrato	4,04	322,58	0,0006	0,57			
	Agua de peptona/ácido acético	3,84	4,36	0,0098	0,96	0,34	0,139	0,99
	Agua de peptona/ácido acético	4,08	27,93	0,0021	0,87			
	Agua de peptona/ácido acético	4,54	526,32	0,0002	0,85			
	Caldo de pollo/ácido acético	3,33	2,33	0,0520	0,93	0,41	0,183	0,99
	Caldo de pollo/ácido acético	3,51	5,32	0,0083	0,98			
	Caldo de pollo/ácido acético	3,82	34,97	0,0009	0,93			
	Tampón citrato	3,01	9,87	0,0056	0,95	0,81	0,189	0,96
	Tampón citrato	3,57	21,37	0,0030	0,90			
<i>S. Enteritidis</i>	Tampón citrato	4,08	109,89	0,0003	0,98			
	Agua de peptona/ácido acético	3,52	6,13	0,0107	0,96	0,44	0,018	0,99
	Agua de peptona/ácido acético	4,07	126,58	0,0006	0,93			
	Caldo de pollo/ácido acético	3,03	2,97	0,0094	0,99	0,45	0,901	0,86
	Caldo de pollo/ácido acético	3,57	285,71	0,0005	0,72			
	Caldo de pollo/ácido acético	4,06	526,32	0,0006	0,35			
	Tampón citrato	2,56	5,62	0,0122	0,92	0,50	0,167	0,99
	Tampón citrato	3,06	109,89	0,0007	0,91			
	Tampón citrato	3,52	769,23	0,0001	0,90			

^a Valor D_{pH}

^b Media del error estándar

R² Coeficiente de determinación

Puede parecer notable la resistencia de *S. Enteritidis*, pero está bien documentado que el género *Salmonella* tiene una especial capacidad de sobrevivir a la acidez, que depende del ácido utilizado como han afirmado Foster y Hall (1990), Lee y col. (1994), Greenacre y col. (2003) y Bacon y col. (2003) por citar algunos. Por otra parte, la relativamente escasa resistencia de *P. fluorescens* también está confirmada por otros autores (Adams y Moss, 2008).

La mayor potencia microbicida del ácido acético que la del cítrico ha tenido su corroboración en los valores z_{pH} calculados en esta Tesis. Siempre han sido mayores en tampón citrato, tal como puede observarse en la Tabla 5. El mayor efecto del acético se debe, entre otros factores a que, a un mismo pH, el acético está menos dissociado que el cítrico (ver Tabla 2) y, al tener las células bacterianas una carga superficial negativa, las sustancias no dissociadas (sin carga) pueden penetrar en ellas mientras que las ionizadas no pueden hacerlo. Por tanto, cuanto más dissociado se encuentre un ácido, menos puede penetrar en la célula, motivo por el que a pHs no muy ácidos, el efecto microbicida es mínimo, ya que se unen, la escasa proporción de H^+ libres y que el ácido que lo libera está muy dissociado. Al bajar el pH, la proporción de ácido sin dissociar aumenta y ya puede introducirse en la célula y, al penetrar en ella, en un medio cercano a la neutralidad, se dissociará y la liberación del H^+ podrá dañar a las estructuras intracelulares. Conforme se acidifica el medio, la fracción no dissociada va aumentando, produciendo pues una mayor disminución del pH intracelular como ya han constatado muchos autores (Ahmad y Marth, 1989; Young y Foegeding, 1993; Phan-Thanh y col., 2000).

4.2 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DE LA INACTIVACIÓN DE MICROORGANISMOS SOBREVIVIENTES DESPUÉS DE TRATAMIENTOS ACIDIFICANTES

Para analizar la variabilidad de la inactivación microbiana mediante acidificación se aplicaron tratamientos de diferente intensidad a un número elevado de muestras conteniendo un inóculo idéntico y se enumeraron los supervivientes, analizando estadísticamente los datos obtenidos. Para estos experimentos, es crítica la homogeneización de las condiciones de obtención del inóculo para evitar que pudieran sesgar la resistencia de las bacterias. Por otra parte, siempre se intentó que los tratamientos acidificantes abarcaran un rango de inactivación lo más amplio posible para que pudiera apreciarse la posible variabilidad en toda su extensión. Dado el

considerable número de muestras por lote, entre 50 y 80, siempre se tuvo la precaución de manejarlas en un orden preestablecido e intentando tardar el mismo tiempo en inocularlas en el medio acidificante y, tras el tiempo de tratamiento, neutralizar su pH para detener la inactivación (para más detalles véase la sección de Materiales y Métodos).

Los tiempos de tratamiento acidificante a aplicar a cada lote se calcularon a partir de los valores z_{pH} de la Tabla 5. Una vez finalizado el tratamiento inactivante, las muestras se diluían, si era preciso, se sembraban en TSA y los recuentos del número de supervivientes en términos de logaritmos decimales de supervivientes se procesaron con el programa VariFit, utilizando la función DISTR.NORM., una aplicación de Microsoft Excel, que permite el ajuste de los datos a una distribución normal y calcula los parámetros que definen las distribuciones de frecuencia, en especial la media aritmética (m) y la desviación estándar (Sd), que determinan la curva en forma de campana típica de estas distribuciones, la Sd se consideró como un reflejo exacto de la variabilidad que pudiese observarse. Es evidente que cuanto mayor es esta, más aplanada se hace la curva normal y más distantes entre sí serán los datos (recuentos de supervivientes) máximo y mínimo observado y predicho por el ajuste.

Las Figuras 31, 32, 33 y 34 muestran las distribuciones de frecuencias de *E. faecalis*, *L. innocua*, *P. fluorescens* y *S. Enteritidis*, respectivamente, en los tres sustratos analizados. Las inactivaciones que figuran en estas gráficas son las esperadas, mientras que en la Tabla 6 se muestran ambas, las esperadas de acuerdo con el valor z_{pH} de la Tabla 5, y las reales, calculadas a partir de recuentos del inóculo y de los supervivientes al tratamiento. Tanto las representaciones gráficas de los histogramas como del ajuste (línea roja) se obtuvieron al procesar los datos en el programa VariFit. Nótese que el aspecto de los histogramas es manipulable modificando los intervalos de sus valores. Los presentados son tal cuales los ofrece el programa para evitar un sesgo en su presentación por lo que, en algún caso, la forma de los histogramas recuerda poco a la acampanada disposición de la curva normal, mientras que otros se asemejan mucho a la esperable curva gaussiana. Los ajustes que hace el VariFit son siempre en el intervalo de datos obtenidos, no extrapolando, por lo que en las gráficas se aprecia un corte justo encima de los valores medios de los intervalos extremos de los histogramas, nunca llegando hasta el eje de abscisas.

Así mismo, con este programa puede calcularse la frecuencia relativa de que un lote determinado contenga un número de supervivientes entre dos valores concretos **a** y **b**, esta frecuencia vendría determinada por el área circunscrita entre los valores **a** y **b** de abscisas y la curva (Ecuación 26). También podría calcularse la frecuencia relativa de que el número de supervivientes sea mayor de un valor cualquiera, n , que sería el área encerrada por la curva desde ese valor n hasta el infinito, aunque de acuerdo al ajuste del VariFit que solo contempla los valores obtenidos dentro del intervalo del muestreo, este valor tendría un cierto error, aunque es de esperar que sea bastante pequeño y, dada su importancia práctica para la determinación del riesgo que puede asumirse al aplicar un determinado tratamiento a un producto con una carga microbiana conocida, no debe despreciarse.

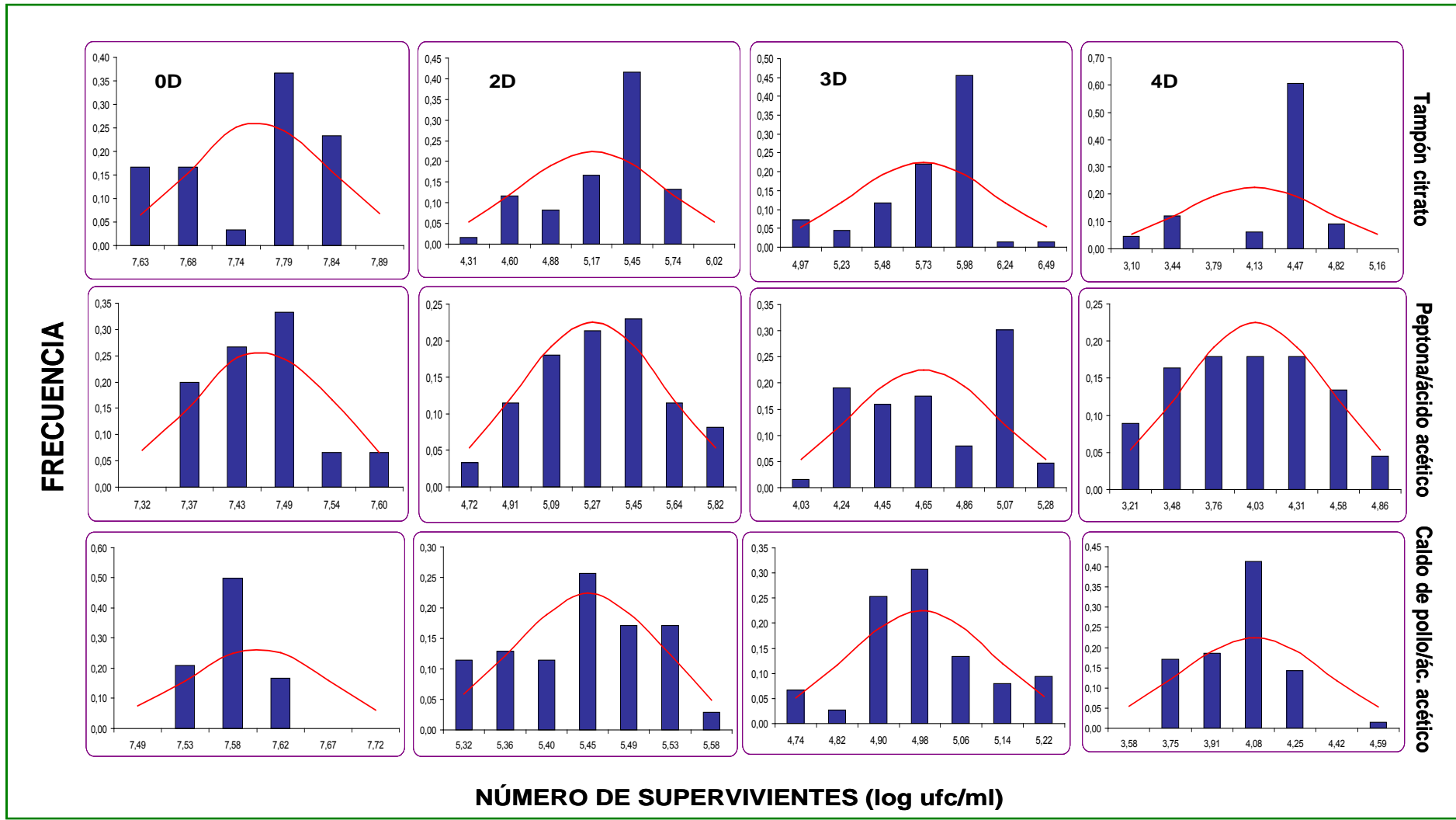


Figura 31. Distribuciones de frecuencias de *Enterococcus faecalis* supervivientes a diferentes tratamientos acidificantes (desde 0 hasta 4 ciclos logarítmicos de inactivación) en tampón citrato ($D_{pH\ 3,59}$ 7,9 min), peptona/ácido acético ($D_{pH\ 3,08}$ 2,7 min) y caldo de pollo/ác. acético ($D_{pH\ 2,80}$ 6,8 min). Datos obtenidos de la Tabla 6.

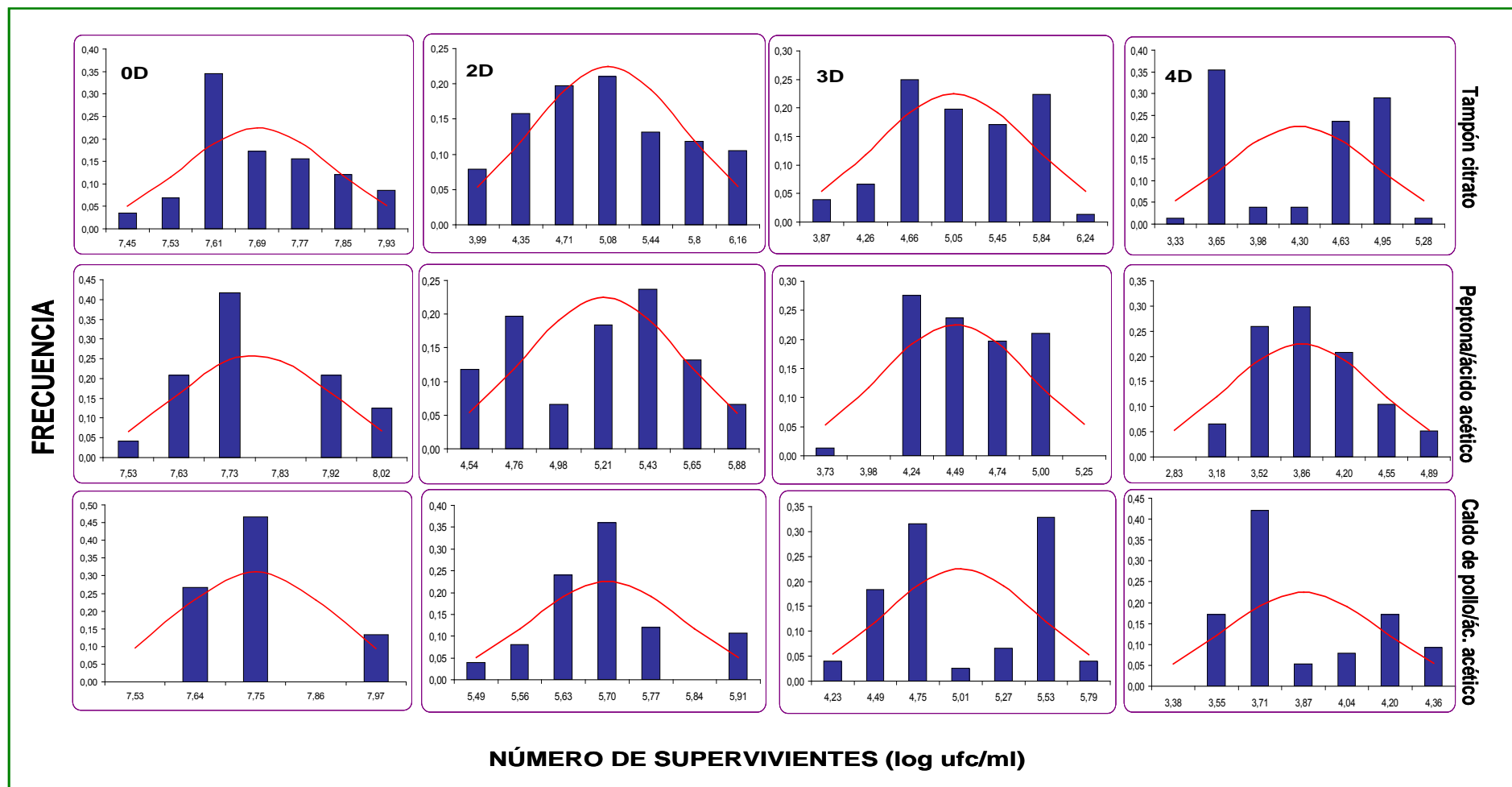


Figura 32. Distribuciones de frecuencias de *Listeria innocua* supervivientes a diferentes tratamientos acidificantes (desde 0 hasta 4 ciclos logarítmicos de inactivación) en tampón citrato ($D_{pH\ 2,97}\ 7,3\ \text{min}$), peptona/ácido acético ($D_{pH\ 3,48}\ 18,0\ \text{min}$) y caldo de pollo/ácido acético ($D_{pH\ 3,13}\ 8,0\ \text{min}$). Datos obtenidos de la Tabla 6.

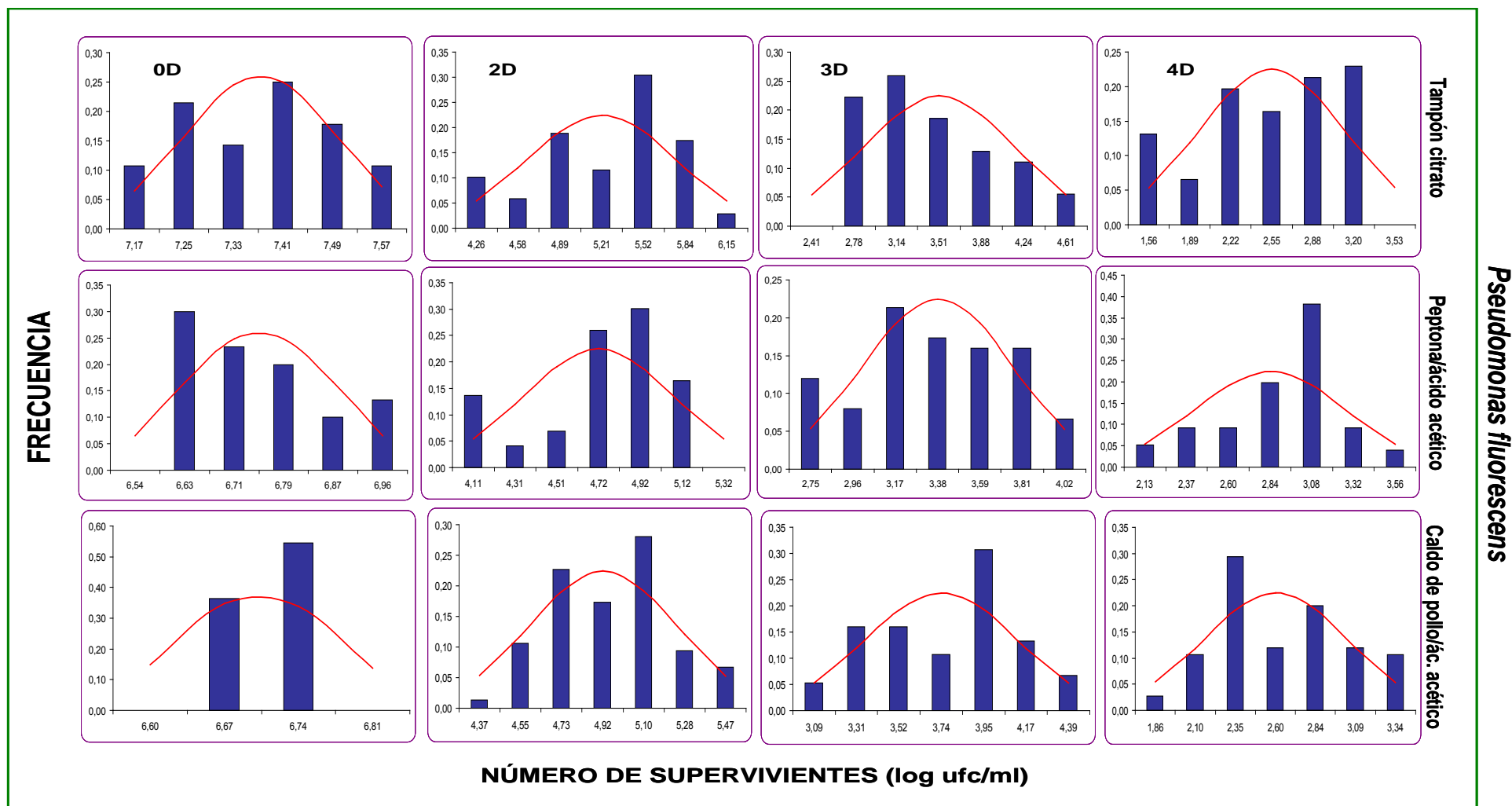


Figura 33. Distribuciones de frecuencias de *Pseudomonas fluorescens* supervivientes a diferentes tratamientos acidificantes (desde 0 hasta 4 ciclos logarítmicos de inactivación) en tampón citrato ($D_{pH\ 3,77}$ 59,6 min), peptona/ácido acético ($D_{pH\ 4,03}$ 17,7 min) y caldo de pollo/ác. acético $D_{pH\ 3,80}$ 29,4 min. Datos obtenidos de la Tabla 6.

Salmonella Enteritidis

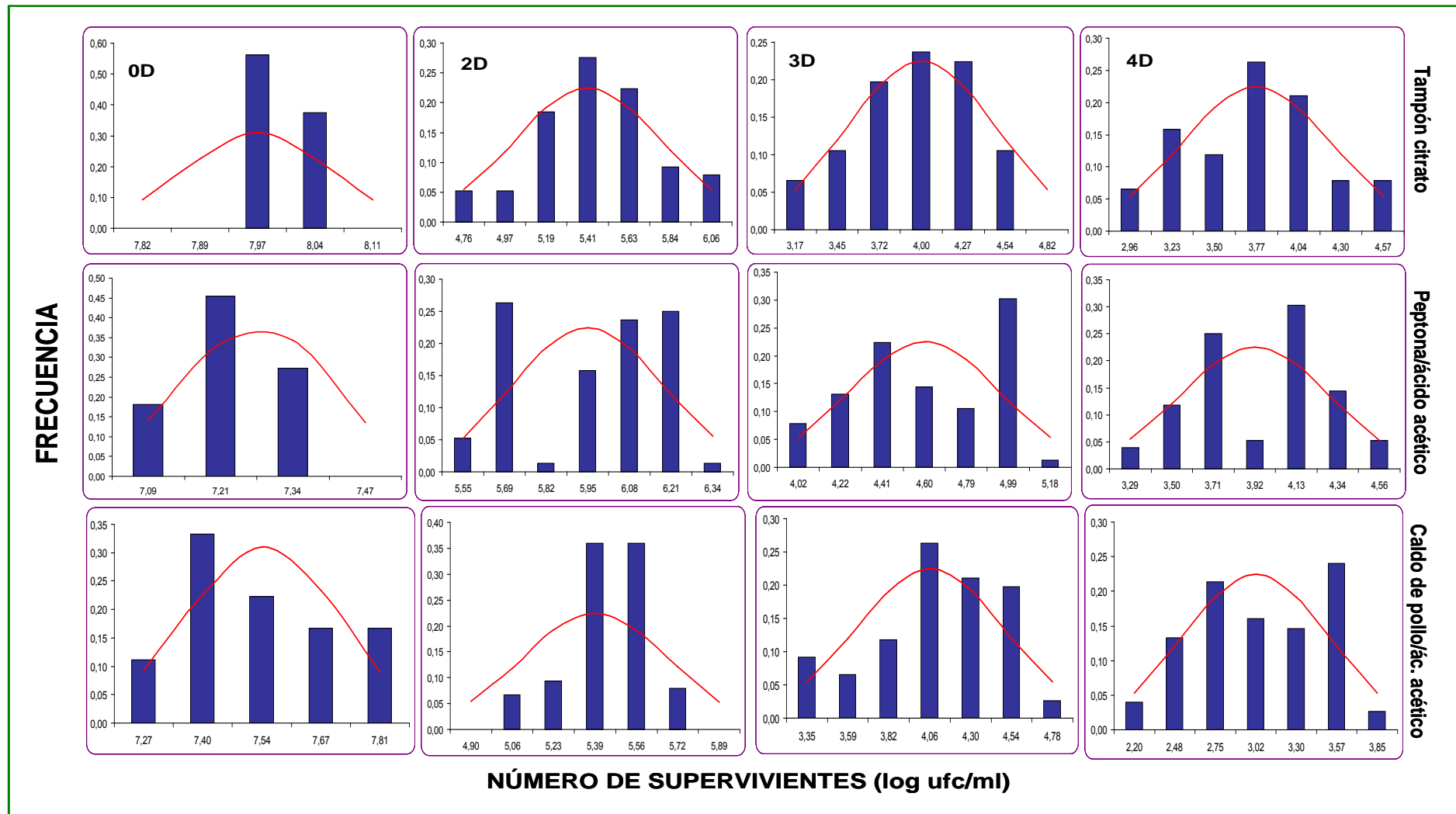


Figura 34. Distribuciones de frecuencias de *Salmonella* serovar Enteritidis supervivientes a diferentes tratamientos acidificantes (desde 0 hasta 4 ciclos logarítmicos de inactivación) en tampón citrato ($D_{pH\ 3,07}$ 80,1 min), peptona/ácido acético ($D_{pH\ 3,80}$ 30,0 min) y caldo de pollo/ácido acético ($D_{pH\ 3,40}$ 35,0 min). Datos obtenidos de la Tabla 6.

El análisis de la variabilidad puede hacerse en función de la *Sd* de las distribuciones obtenidas o considerando los coeficientes de variación (*CV*), una medida porcentual que considera la *Sd* y la media de la distribución ($100 \cdot Sd / \text{media}$) y que no se ve afectada por los valores absolutos de los datos. En todos los casos, cuanto más intenso fue el tratamiento acidificante, con inactivaciones esperadas desde 0 a 4 pasando por 2 y 3 ciclos, las desviaciones estándar (*Sd*) y los *CV* aumentaban como se muestra en la Tabla 6. Los *CV* dieron un incremento de la variabilidad más proporcional a la intensidad del tratamiento acidificante que la *Sd*. En algunos casos el aumento era paulatino, por ejemplo *L. innocua* en agua de peptona/ácido acético, mientras que en otros, no se seguía un patrón tan definido, como la propia *L. innocua* en tampón citrato. De todas maneras y a pesar de esta y otras pocas desviaciones a la norma, puede decirse que la variabilidad es proporcional a la intensidad del tratamiento acidificante tanto si se considera la *Sd* como los *CV* de las distribuciones obtenidas. A una conclusión idéntica llegó Aguirre (2012) al someter a las mismas cepas aquí estudiadas a tratamientos térmicos y con electrones acelerados. Es decir, de una forma general puede concluirse que cuanto más intenso es un tratamiento microbicida conservante de alimentos, menor será el número de supervivientes, pero más variable resulta este. Esta conclusión es de gran relevancia para la industria alimentaria en muchas facetas. Analícese una. Piénsese en una materia prima que pueda contener del orden de 1000 ufc/g de una bacteria de las que se exige su ausencia en una determinada masa de producto (por ejemplo, 25 g), es obvio que el número de supervivientes a un tratamiento que persigue una total destrucción será muy pequeño, quizás del orden de 10^{-4} ufc/g, tras aplicar un tratamiento que reduce en 7 ciclos logarítmicos esa población. Pero esa cifra (10^{-4} ufc/g) hace referencia a una media o moda, es decir, el valor que coincide con el máximo de la curva normal de las distribuciones de frecuencias del número de supervivientes obtenida para ese caso. Si se dispusiera de la *Sd* de esa distribución, podría calcularse el riesgo que se asume, es decir qué frecuencia queda encerrada entre la curva normal y el eje de abscisas a partir de un valor de 1/25 ufc/g. Es posible que el riesgo asumido en esas condiciones no sea admisible para el industrial y precise modificar sus condiciones de trabajo aplicando un tratamiento microbicida más intenso o quizás, el riesgo le parezca excesivamente pequeño y opte por aplicar uno de menor intensidad. Pero la aplicación de un tratamiento cualquiera, sin conocer la variabilidad de tal tratamiento es algo empírico, solo basado en la experiencia. El cálculo de la distribución de frecuencias y su aplicación, lo eleva al rango de científico.

4.2.1 Factores que influyen en la variabilidad de la inactivación ácida

La columna “Inactivación esperada” de la Tabla 6 muestra el número de ciclos logarítmicos de inactivación del microorganismo en cuestión, de acuerdo con los valores experimentales obtenidos previamente y mostrados en la Tabla 5. La comparación de los valores de esta columna con los de la “Inactivación lograda”, que son la media de los, al menos, setenta datos obtenidos experimentalmente, da una idea de que la variabilidad existe y que no tenerla en cuenta solo conducirá a errores. Es cierto que las diferencias entre la inactivación esperada y la alcanzada pueden deberse a errores metodológicos. Una mínima diferencia en el pH (dado su carácter logarítmico) conduce a diferencias más que significativas en la concentración de hidrogeniones libres en el medio y esto, obviamente, puede tener consecuencias en la repetitividad de las pruebas. Por otra parte, el manejo de más de setenta muestras en una misma experiencia y con tiempos de tratamiento de minutos para los diferentes grados de inactivación (por ejemplo, 0, 5’3, 8’0 y 10’7 minutos para una inactivación de *E. faecalis* de 0, 2, 3 y 4 ciclos en agua de peptona/ácido acético), hace que cualquier mínima desviación de dichos tiempos de tratamiento, conlleven errores. A este respecto, ya se ha mencionado que se tuvo la precaución de manejar las setenta y cinco muestras siempre en el mismo orden e intentando invertir el mismo tiempo en inocular la bacteria en el medio acidificado que en su extracción de dicho medio y su inmersión en el tampón neutralizado que detiene el tratamiento acidificante. Así mismo, el inóculo se trató siempre en las mismas condiciones para evitar que a las muestras de algunas experiencias se les indujera, inconscientemente, una mayor resistencia a la acidificación que a otras, siempre se utilizó el mismo acidulante, siempre los mismos medios, etc., en pocas palabras, homogeneización de las muestras. En suma, se intentaron evitar las posibles fuentes de errores de las que los responsables de esta Tesis fueron conscientes. Otros autores describen en sus investigaciones diferencias en el grado de inactivación mediante acidificación y apuntan que la velocidad de inactivación no sólo depende del pH alcanzado, sino que depende más de la identidad y concentración del acidulante usado para modificar el pH (Buchanan y col., 1993a). Además, hay cepas capaces de metabolizar a los ácidos acético y cítrico (Chipley, 1993; Sofos y Busta, 1993), un hecho que puede modificar el grado de inactivación en algunos casos, sobre todo a valores de pH o de concentración del ácido próximos a los que pueden ser fronteras entre la inactivación y el aprovechamiento metabólico y obtención de energía para,

incluso, multiplicarse. En estas condiciones sería fácil observar variabilidad entre unas experiencias y otras porque mínimas diferencias en el pH pueden ocasionar el cruce de esa supuesta frontera e incluso a un idéntico pH y/o concentración del acidulante, el estado fisiológico de las células componentes de la población, podrían determinar un comportamiento diferente. Además, la variabilidad de las capacidades fisiológicas de los microorganismos hace que no todos actúen homogéneamente en bloque, ante las mismas condiciones y, esta diversidad suele ser más notoria cuando las condiciones de crecimiento distan mucho de las óptimas o cuando se ha sometido a la población a operaciones de inactivación o estrés (Aguirre y col., 2011) como las empleadas en esta Tesis.

Tabla 6.

Inactivación de *Enterococcus faecalis*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas fluorescens* y *Salmonella* Enteritidis en peptona/ácido acético, caldo de pollo/ácido acético y tampón citrato después de diferentes tratamientos de acidificantes.

Microorganismos	Sustratos	pHs	Inactivación Esperada	Tiempo (min)	Nº de muestras	Media de los supervivientes (log cfu/muestra)	Sd ^a	Inactivación lograda (-log cfu/muestra)	Min ^a	Max ^b	Coefficiente de variación (%) (100 SD/media)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Peptona/ácido acético	3,08	0	0,0	30	7,4	0,08	0,0	7,3	7,6	1,1
			2	5,3	61	5,2	0,32	2,3	4,6	5,8	6,2
			3	8,0	63	4,6	0,37	2,9	3,8	5,3	8,0
			4	10,7	67	3,9	0,48	3,5	3,0	4,8	12,3
	Caldo de pollo/ácido acético	2,80	0	0,0	24	7,6	0,07	0,0	7,4	7,7	0,9
			2	13,7	70	5,4	0,08	2,2	5,3	5,6	1,4
			3	20,5	75	4,9	0,14	2,6	4,7	5,2	2,8
			4	27,4	70	4,0	0,29	3,6	3,4	4,6	7,4
	Tampón citrato	3,59	0	0,0	30	7,7	0,08	0,0	7,6	7,9	1,0
			2	16,0	68	5,6	0,44	2,1	4,7	6,5	7,9
			3	24,0	60	5,0	0,50	2,7	4,0	6,0	9,9
			4	31,9	66	4,0	0,60	3,8	2,8	5,1	15,2
<i>Listeria innocua</i>	Peptona/ácido acético	3,48	0	0,0	24	7,7	0,15	0,0	7,4	8,0	1,9
			2	36,1	75	5,1	0,39	2,6	4,3	5,9	7,7
			3	54,2	75	4,4	0,44	3,4	3,5	5,2	10,2
			4	72,2	75	3,7	0,60	4,0	2,5	4,9	16,2
	Caldo de pollo/ácido acético	3,13	0	0,0	15	8,5	0,04	0,0	8,4	8,6	0,5
			2	16,1	75	6,5	0,10	1,9	6,3	6,7	1,6
			3	24,2	75	5,7	0,26	2,8	5,2	6,2	4,6
			4	32,2	75	4,7	0,29	3,8	4,1	5,3	6,2
	Tampón citrato	2,97	0	0,0	58	7,7	0,14	0,0	7,4	7,9	1,8
			2	14,7	75	5,9	0,63	1,8	4,7	7,1	10,8
			3	22,0	75	4,9	0,69	2,8	3,5	6,2	14,2
			4	29,4	75	4,1	0,57	3,5	3,0	5,3	13,7
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Peptona/ácido acético	4,03	0	0,0	30	6,7	0,12	0,0	6,5	7,0	1,8
			2	35,4	73	4,6	0,35	2,1	3,9	5,3	7,6
			3	53,1	75	3,3	0,37	3,4	2,6	4,0	11,3
			4	70,8	75	2,7	0,42	4,0	1,9	3,5	15,4
	Caldo de pollo/ácido acético	3,80	0	0,0	11	6,7	0,07	0,0	6,5	6,8	1,0
			2	58,9	75	4,8	0,32	1,8	4,2	5,5	6,6
			3	88,3	75	3,6	0,38	3,2	2,9	4,4	10,5
			4	117,7	75	2,5	0,43	4,2	1,6	3,3	17,4
	Tampón citrato	3,77	0	0,0	28	7,3	0,12	0,0	7,1	7,6	1,6
			2	119,3	69	5,1	0,55	2,3	4,0	6,1	10,9
			3	178,9	54	3,3	0,64	4,0	2,1	4,6	19,2
			4	238,5	61	2,8	0,57	5,0	1,3	3,5	20,1
<i>Salmonella</i> Enteritidis	Peptona/ácido acético	3,80	0	0,0	11	7,2	0,13	0,0	7,0	7,5	1,8
			2	60,0	75	5,9	0,23	1,3	5,4	6,3	3,9
			3	90,1	75	4,5	0,34	2,7	3,8	5,2	7,5
			4	120,1	75	3,8	0,37	3,4	3,1	4,5	9,7
	Caldo de pollo/ácido acético	3,40	0	0,0	18	7,5	0,17	0,0	7,1	7,8	2,3
			2	70,1	75	5,3	0,29	2,2	4,7	5,9	5,5
			3	105,2	75	4,0	0,42	3,5	3,1	4,8	10,6
			4	140,2	75	2,9	0,48	4,6	2,0	3,8	16,6
	Tampón citrato	3,07	0	0,0	16	7,9	0,09	0,0	7,8	8,1	1,1
			2	160,1	75	5,3	0,38	2,6	4,6	6,0	7,2
			3	240,2	75	3,9	0,48	4,1	2,9	4,8	12,4
			4	320,3	75	3,6	0,47	4,3	2,7	4,6	12,9

Sd: Desviación estándar (log ufc/muestra)

^aConcentración mínima de microorganismos por muestra (log ufc/muestra)

^bConcentración máxima de microorganismos por muestra (log ufc/muestra)

Investigaciones realizadas por Fernández y col. (2009) confirman que la inactivación microbiana se ve afectada por el tipo de acidulante. Así por ejemplo *Enterococcus faecium* en BHI/ácido acético a pH 5,4 reduce 2,5 ciclos logarítmicos en 10 min, en muestras de BHI/ácido láctico en 4,7 min y BHI/ácido cítrico en 12,5 min, siempre al mismo pH. Por otro lado Álvarez-Ordóñez y col. (2009) inocularon *Salmonella typhimurium* fue prácticamente idéntica con los ácidos acético, láctico y cítrico, necesitándose entre 9 y 10 minutos para alcanzar los 4 ciclos de inactivación en extracto de carne a pH 4,5.

Es bien sabido que los componentes y características de los sustratos pueden tener efectos aditivos o sinérgicos o, por el contrario, proteger a los microorganismos. Por ejemplo, la actividad del agua del alimento afecta al pK_a de los ácidos orgánicos y por ello alterar su efecto antimicrobiano (Pethybridge y col., 1983; Rouse y col., 1988; Krish y Szajani, 1997) ya que al eliminar agua de un producto, la concentración de todos los componentes se incrementa y, por tanto, el grado de disociación de los ácidos cambia. Por otra parte, el ácido acético es más microbicida que otros ácidos, debido a su bajo peso molecular y su gran liposolubilidad, que facilita su difusión a través de la membrana citoplasmática de la bacteria (Fernández y col., 2009). Además, el componente lipídico del sustrato (alimento o medio de cultivo, etc.) interviene decisivamente en la capacidad de inactivación de los ácidos, ya que los más liposolubles se disuelven más en el medio graso quedando incapacitados para ejercer su posible efecto microbicida (Sofos y Busta, 1993). Por tanto no es de extrañar que las bacterias sean más resistentes a la acidez en caldo de pollo, alimento con un cierto contenido graso, que en peptona o tampón citrato, donde no hay lípidos. A este respecto, Waterman y Small (1998), aseguraron que la resistencia a la acidez se ve potenciada en sustratos no solo ricos en grasa, sino también en los caracterizados por un elevado contenido proteico. Ejemplos pueden ser el chocolate y quesos, que pueden ser ácidos, y han sido vehículos de brotes salmonelóticos. Asimismo la capacidad tampón del alimento es otro factor importante que limita el descenso del pH en el interior de la célula bacteriana (Lindsay, 2000). El agua de peptona sólo aporta los elementos nutritivos necesarios para el buen mantenimiento y desarrollo de los microorganismos, con una capacidad tampón muy limitada que le permita al microorganismo regular su pH intracelular (Brown y Booth, 1991).

Por otra parte, la presencia en el medio de tratamiento de algunos aminoácidos puede modificar la resistencia ácida, posibilitando a los microorganismos supervivientes el desarrollo de una respuesta de tolerancia. Numerosos estudios han demostrado que la inclusión en el medio de tratamiento de arginina, lisina y ácido glutámico, incrementa la supervivencia de *Escherichia coli* en condiciones extremas de acidez (Castaine-Cornet y col., 1999; Castaine-Cornet y Foster, 2001; Iyer y col., 2003; Foster, 2004).

4.2.2 Análisis de correlación y regresión

El análisis estadístico realizado hasta ahora corresponde a una fase descriptiva de todos los datos. Se ha sintetizado la información en Tablas y representaciones gráficas de distribuciones de frecuencia. Si bien estas presentaciones son útiles, puede llevarnos a forjar una opinión subjetiva sobre la variabilidad en estudio. Es, por tanto, imprescindible realizar un análisis matemático no tan superficial, para valorar la bondad del ajuste de la distribución normal y los parámetros que la caracterizan, la media de la distribución y su desviación estándar. En este sentido existen en la bibliografía científica varias opciones que permiten evaluar cuantitativamente la variabilidad; en esta Tesis se ha optado por el modelo de correlación y regresión lineal simple, modelizada por la ecuación de la recta ($y = ax + b$), con la que se calculan dos parámetros, *a* (pendiente) y *b* (ordenada en el origen), que definen la recta con la que, a partir de la variable independiente *x* (grado de inactivación alcanzado al aplicar un pH determinado), se estima el valor de la variable dependiente *y* (*Sd* de la inactivación). Este modelo de correlación y regresión lineal es el más empleado para el análisis estadístico de datos experimentales (Pérez, 2006), por ser el más simple e intuitivo.

El gráfico bidimensional del modelo ajustado de la Figura 35 (A, B y C), nos permite una evaluación visual del efecto de la intensidad del tratamiento acidificante en la variabilidad de la respuesta microbiana, es decir, en la variabilidad del número de bacterias que permanecen viables tras el tratamiento. Las rectas coloreadas se corresponden con los puntos del mismo color, mientras que la recta negra es un compendio de la variabilidad de todos ellos. En la Figura 35A se recogen los datos de caldo de pollo/ácido acético, en la B los de agua de peptona/ácido acético y en la C los de tampón citrato. La tendencia observada en todos los casos es lo suficientemente

clara. Cuanto más intenso fue el tratamiento acidificante, mayor fue la *Sd* de la distribución del número de supervivientes.

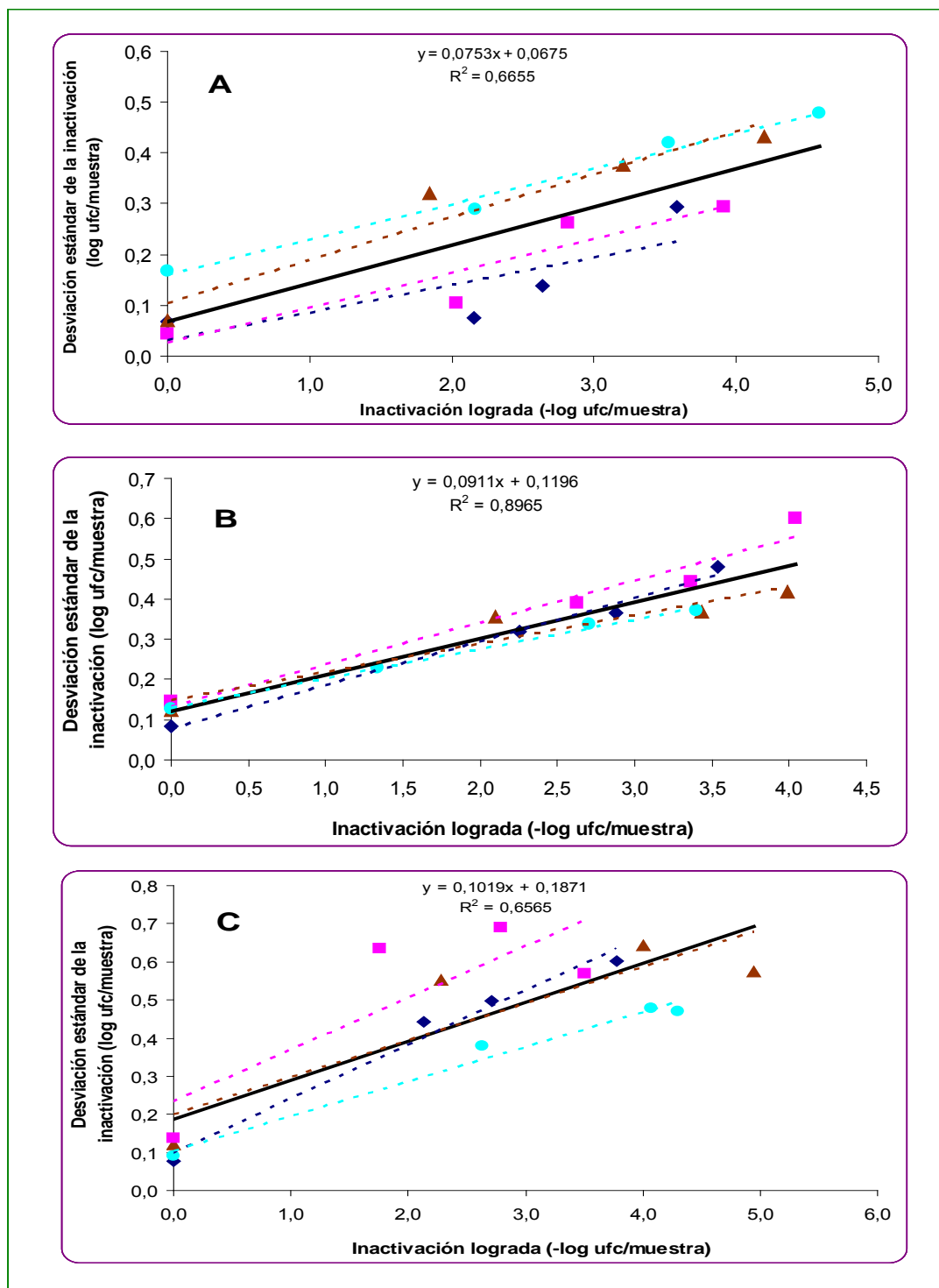


Figura 35. Efecto de la inactivación en caldo de pollo/ácido acético (A), peptona/ácido acético (B) y tampón citrato (C) en la variabilidad en el número de supervivientes de *E. faecalis* (rombos y línea punteada azul), *L. innocua* (cuadrados y línea punteada rosa), *P. fluorescens* (triángulos y línea punteada marrón) y *S. Enteritidis* (círculos y línea punteada turquesa). Las líneas punteadas muestran la relación encontrada en los diferentes tratamientos. La línea negra es la regresión lineal de todos los datos analizados conjuntamente.

En la Tabla 7 se condensan las características de las rectas de regresión obtenidas. Todas ellas están construidas con 4 puntos correspondientes a grados de inactivación de 0, 2, 3 y 4 ciclos logarítmicos. Puede considerarse que las pendientes son relativamente homogéneas, así como los términos independientes, siempre positivos. En cambio, se apreciaron coeficientes de correlación bastante diferentes, la mayoría demuestran que la correlación es buena, con valores por encima de 0,91, pero hubo algunos que distaban de ese valor, sobre todo los correspondientes a inactivaciones en caldo de pollo/ácido acético ($R^2 = 0,61$ ó $R^2 = 0,86$). Podría pensarse que a este sustrato pudiera faltarle homogeneidad por ser un producto que se adquiría en el mercado, pero las experiencias correspondientes a un microorganismo se desarrollaron a partir de un único envase, cuyo pH se ajustaba al adecuado para lograr la inactivación buscada. No obstante, el caldo de pollo/ácido acético no ha sido el único sustrato que ha dado malos coeficientes de correlación (tampón citrato $R^2 = 0,67$ y $R^2 = 0,78$), por lo que no debe culparse a la naturaleza del sustrato sino, quizás, a errores metodológicos puntuales, de la escasa correlación apreciada en ciertos casos.

Tabla 7.

Características de las rectas regresión que muestran el efecto del grado inactivación mediante acidificación en la desviación estándar de la inactivación lograda, o lo que es lo mismo, la variabilidad del número de supervivientes al tratamiento en diferentes sustratos. Las rectas están representadas en la Figura 35.

Microorganismos	Sustratos	Pendiente	Término independiente	SE	Coefficiente de determinación (R^2)
<i>Enterococcus faecalis</i>	Peptona/ác. acético	0,1080	0,0789	0,0228	0,9876
	Caldo de pollo/ác. acético	0,5443	0,0309	0,0794	0,6169
	Tampón citrato	0,1420	0,0992	0,0416	0,9778
<i>Listeria innocua</i>	Peptona/ác. acético	0,1043	0,1333	0,0455	0,9610
	Caldo de pollo/ác. acético	0,0682	0,0268	0,0542	0,8664
	Tampón citrato	0,1356	0,2345	0,1757	0,6750
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	Peptona/ác. acético	0,0706	0,1486	0,0481	0,9103
	Caldo de pollo/ác. acético	0,0846	0,1051	0,0517	0,9298
	Tampón citrato	0,0967	0,2004	0,1366	0,7802
<i>Salmonella Enteritidis</i>	Peptona/ác. acético	0,0729	0,1306	0,0090	0,9956
	Caldo de pollo/ác. acético	0,0697	0,1600	0,0188	0,9878
	Tampón citrato	0,0909	0,1051	0,0336	0,9772

SE: Error estándar

Las rectas de la Tabla precedente representan:

$$Sd = \text{Pendiente} * \text{Inactivación lograda} + \text{Término independiente}$$

Es decir, cada una de ellas es un modelo de la variabilidad del tratamiento acidificante en las condiciones de los análisis.

El coeficiente de correlación es una medida de la relación lineal entre dos variables aleatorias cuantitativas que, a diferencia de la covarianza, es independiente de la escala de medida de las variables por lo que su valor puede compararse con el correspondiente a otra serie de muestras, aunque sus valores difieran. Por este motivo, este parámetro se utiliza con frecuencia para analizar la influencia de la variable independiente en la dependiente, en este caso, la intensidad del tratamiento inactivante en el número de supervivientes. Por ejemplo, Pérez-Rodríguez y col. (2007) ajustaron dos modelos (log-linear y Weibull) para describir la contaminación cruzada de *E. coli* 0157:H7 y *Staphylococcus aureus* durante el lonchado de productos cárnicos cocidos y analizaron la regresión mediante el coeficiente de correlación. El coeficiente de determinación (R^2) es el cuadrado del coeficiente de correlación y su valor puede interpretarse como la proporción de la variabilidad de la variable dependiente que puede atribuirse a la variabilidad de la independiente. Por este motivo suele ser un parámetro muy utilizado, como es el caso de los datos ofrecidos en la Tabla 7.

Otros autores han trabajado en la variabilidad de la inactivación mediante tratamientos térmicos (Aguirre y col., 2009a) y con electrones acelerados (Aguirre y col., 2011) y han observado idénticas tendencias a las aquí descritas. Cuanto más intenso es el tratamiento conservante, menos supervivientes quedan, pero su número es más variable. No obstante, debe señalarse que los coeficientes de determinación observados por Aguirre y col (2009a, 2011) son, a grandes rasgos, más elevados que los aquí mostrados para los tratamientos en tampón citrato y caldo de pollo/ácido acético, siendo similares a los de agua de peptona/ácido acético. En realidad, debe considerarse que el manejo de los tratamientos acidificantes es más difícil de controlar. Una variación de una décima en la determinación del pH puede tener consecuencias en el grado de inactivación, mientras que pequeñas variaciones en la aplicación del tratamiento térmico (décimas de grado Celsius o unos segundos más o menos de aplicación) a las temperaturas en las que trabajaron Aguirre y col. (entorno de 50-60°C

para las formas vegetativas) tienen menos consecuencias. Además, piénsese que cualquier variación en el pH influye en el grado de disociación del ácido y esto tiene consecuencias directas en el poder microbicida del medio, como ya se ha discutido con anterioridad. Debe considerarse que el ajuste del pH en todos los medios utilizados en esta Tesis fue el más cuidadoso, se tuvo la precaución de utilizar siempre el mismo pHmetro, que se calibraba con soluciones estándar cada vez que se empleaba, pero, no obstante, y a la vista de algunos de los resultados obtenidos, parece que en algunos casos, los menos, no se logró el ajuste buscado sino uno cercano. Por otra parte, es bien sabido que la aplicación de calor tiene un ligero efecto en el pH de los sustratos. Así, el pH del agua de peptona y del tampón citrato, que se esterilizaban tras haberlos acidificado, se determinó siempre en un alícuota que se esterilizaba a la vez que las muestras utilizadas en los ensayos de inactivación.

De todas maneras, los coeficientes de determinación observados aquí son similares a los descritos por otros autores. Por ejemplo, los modelos de Buchanan y col. (1993a) para *L. monocytogenes* en BHI/ác. láctico tenía un coeficiente de determinación de 0,87 y el de BHI/ác. acético de 0,77.

Una mayor variabilidad conforme se intensifica el tratamiento estresante ya fue observada hace años Buchanan y col. (1993a), y más recientemente por Koutsoumanis y Sofos (2004) y Álvarez (2009). Esta respuesta heterogénea de una población microbiana -teóricamente homogénea- a condiciones de estrés, parece demostrar que no todos sus individuos, incluso aunque tengan un origen común, descender de una misma célula, se comportan de la misma manera. Adams y Nicolaides (1997) aportaron algunos indicios sobre los mecanismos que actúan durante la inactivación ácida, en especial en microorganismos patógenos, indicando que la variabilidad de las respuestas pueden deberse a que las bacterias supervivientes en los primeros momentos del estrés ácido, se hacen resistentes y se adaptan rápidamente a las nuevas condiciones y, por tanto, tienen más posibilidades de recuperarse, revitalizarse y crecer cuando las condiciones así se lo permitan. Estos estudios los confirmaron posteriormente Nightingale y col. (2006). En cambio, Brown y col. (1997) sugirieron que este fenómeno tan complejo es una respuesta fenotípica, en la que las bacterias modifican la composición de ácidos grasos en la membrana celular cuando se hallan en sustratos ácidos. Esta resistencia es de especial relevancia en bacterias patógenas transmitidas por alimentos. Si se adaptan a

condiciones acidificantes, podrían sobrevivir a las condiciones del estómago y del tubo digestivo en general, aumentando las probabilidades de desarrollar enfermedades en el ser humano (Theron y Rykers Lues, 2010).

4.2.3 Análisis de varianzas - Test de Bartlett

El Test de Bartlett es un contraste de hipótesis de igualdad de desviaciones estándar muy utilizado cuando se requiere homogeneidad de varianzas. Aquí se ha utilizado para determinar si existían diferencias significativas entre las desviaciones estándar observadas en los diferentes tratamientos acidificantes y entre los distintos sustratos. La única premisa que deben tener los datos para que pueda aplicarse este test es que sigan una distribución normal. Para llevar a cabo este análisis se recurrió al paquete informático StatGraphics. Esta herramienta informática produce de manera automática una interpretación de fácil comprensión de los resultados analizados estadísticamente. La forma habitual de presentar los resultados es mediante el valor $p < 0,05$ (a veces conocido simplemente como la p , valor p , o bien directamente del inglés p -value). Este valor se define, en contrastes de hipótesis, como la probabilidad de obtener un resultado al menos tan extremo como el que realmente se ha obtenido (valor del estadístico calculado), suponiendo que la hipótesis nula es cierta. Es fundamental tener en cuenta que el valor p está basado en la asunción de una hipótesis de partida (o hipótesis nula). Se rechaza la hipótesis nula si el valor p asociado al resultado observado es igual o menor que el nivel de significación establecido, en este caso 0,05. Es decir, el valor p nos muestra la probabilidad de haber obtenido el resultado, si suponemos que la hipótesis nula es cierta. Las hipótesis aquí contrastadas fueron H_0 : las varianzas de los microorganismos supervivientes son iguales en todos los tratamientos, H_1 : las varianzas de los microorganismos supervivientes son distintas.

El StatGraphics ejecuta varios análisis estadísticos, comprobando si hay diferencias significativas entre las medias de dos o más lotes de muestras; si las hay, los tests de Rangos Múltiples nos indicarán las medias que son significativamente diferentes unas de otras. Así mismo, lleva a cabo el test de Bartlett, que compara las varianzas. Los resultados que arrojó indican que la variabilidad del número de bacterias supervivientes fue significativamente menor en todas las muestras control (sin acidificación), comparadas con la variabilidad del número de viables tras tratar las

muestras con medio ácido. Las Figuras 36 y 37 recogen todas las distribuciones de frecuencias del número de supervivientes por especie y sustrato para dar una idea global y visual de la variabilidad de la inactivación alcanzada con los diferentes tratamientos y sustratos. Por lo general, la simetría de las distribuciones suele ser más que aceptable en las distribuciones de muestras no tratadas y en las que se aplicó un tratamiento acidificante poco intenso (2D). Sin embargo, a medida que se intensifican los tratamientos acidificantes (3D y 4D), las concentraciones finales de microorganismos muestran colas y pierden simetría. Este hecho no se observó de forma tan manifiesta en el número de supervivientes tras tratamientos térmicos y de irradiación (Aguirre y col., 2009a y 2011).

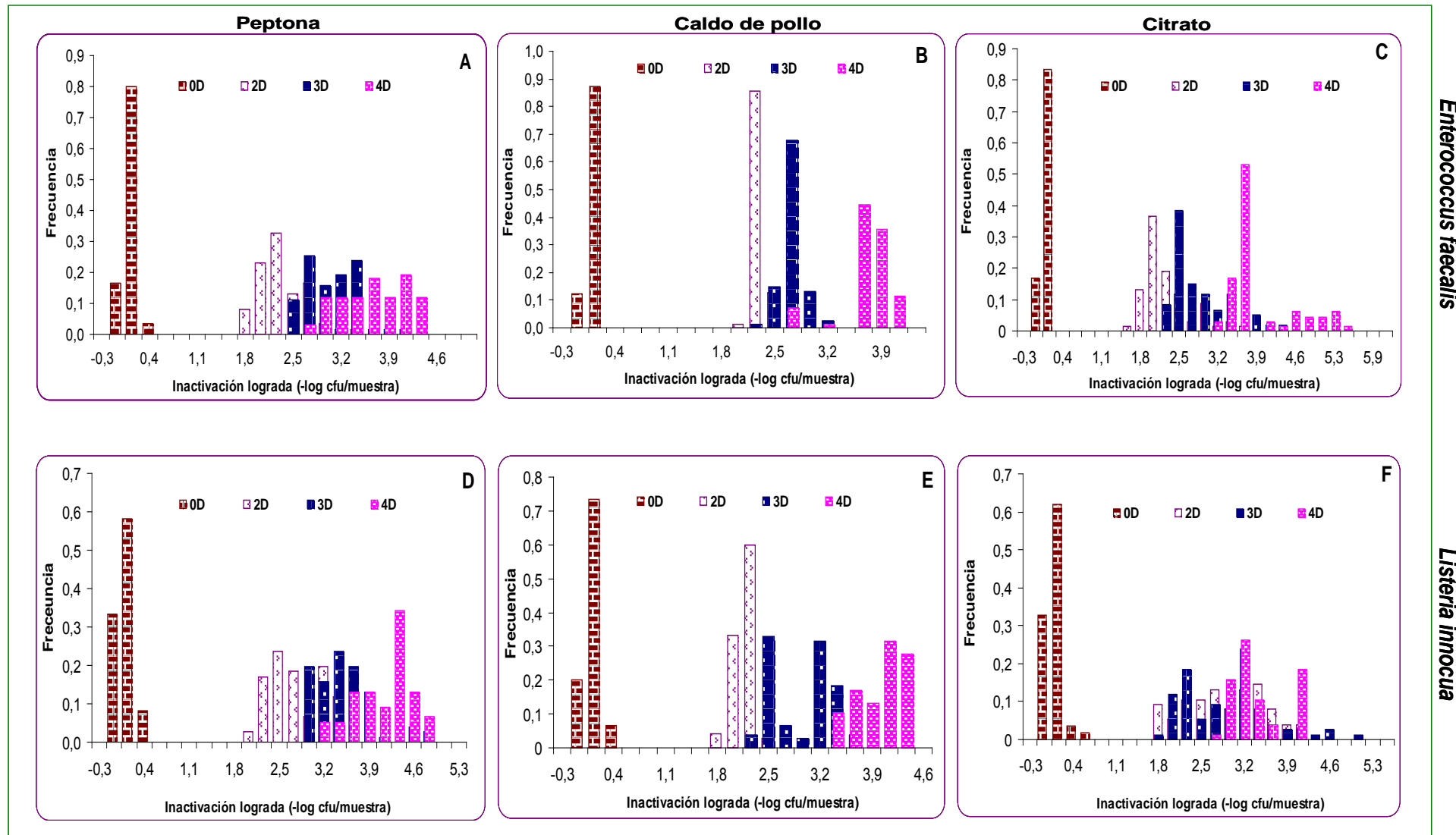


Figura 36. Distribuciones de frecuencias de la inactivación de *Enterococcus faecalis* y *Listeria innocua* tras diferentes tratamientos acidificantes 0D (color marrón), 2D (color violeta) 3D (color azul) y 4D (color rosa) en agua de peptona/ácido acético, caldo de pollo/ácido acético y tampón citrato.

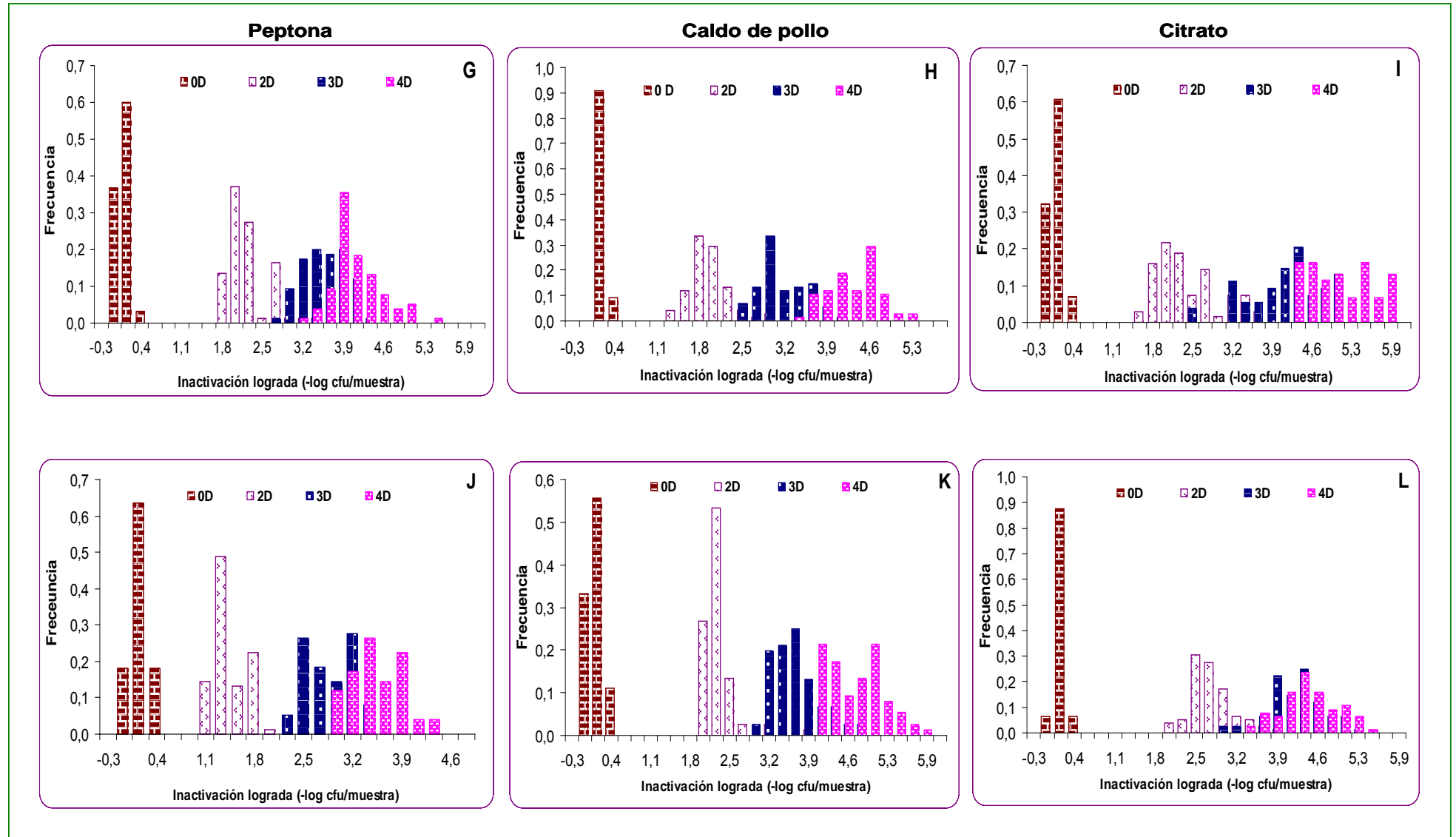


Figura 37. Distribuciones de frecuencias de la inactivación de *Pseudomonas fluorescens* y *Salmonella* Enteritidis tras tratamientos acidificantes 0D (color marrón), 2D (color violeta), 3D (color azul) y 4D (color rosa) en agua de peptona/ácido acético, caldo de pollo/ácido acético y tampón citrato.

La Tabla 8 compendia el análisis de la variabilidad de las distribuciones del número de supervivientes de *Enterococcus faecalis*, *Listeria innocua*, *Pseudomonas fluorescens* y *Salmonella* Enteritidis en agua de peptona/ácido acético, caldo de pollo/ácido acético y tampón citrato. En la mayoría de los casos las distribuciones del número de sobrevivientes (Tabla 8), fueron significativamente diferentes ($p < 0,05$) como se ha puesto de manifiesto en una prueba de comparación múltiple aplicada dentro de, y entre tratamientos, lo que confirma la hipótesis alternativa (H_1). En los artículos de Aguirre y col. se aplicó el test de Bartlett para comparar la variabilidad de la inactivación mediante tratamientos térmicos (2009a) y de irradiación con electrones acelerados (2011). Los resultados de estos autores difieren de los observados al comparar la variabilidad de la inactivación mediante acidificación ya que los antedichos autores observaron más diferencias significativas entre tratamientos tanto al comparar tratamientos diferentes en el mismo sustrato como el mismo tratamiento en sustratos diferentes, leche y solución salina al 0,75% para los tratamientos térmicos y agar soja tripticasa y jamón cocido para la irradiación. En cambio, la variabilidad de la inactivación mediante acidificación ha mostrado, *grosso modo*, menos diferencias significativas (Tabla 8), sobre todo cuando se aplicaban los tratamientos más intensos. Quizás la explicación a este hallazgo radique en la hipótesis de Theron y Rykers Lues (2010), quienes, a propósito de la exposición de microorganismos a ambientes ácidos indicaron que si los microorganismos sobreviven a un shock ácido van a liberar proteínas de estrés que les podrían proporcionar una sobreprotección a pHs ácidos, aunque la linealidad observada en la inactivación (Figuras 26, 27, 28 y 29) no contribuye a corroborar la hipótesis. Piénsese que cuando los tiempos de aplicación del tratamiento acidificantes son cortos, es dudoso que permitan a las células reaccionar tan rápidamente y sintetizar las proteínas que podrían sobreprotegerle. En cambio, con tratamientos de horas, como en algunos de los casos de esta tesis, ya cabe pensar en la síntesis de dichas proteínas. No obstante, si se comparan los tratamientos más largos con los más cortos, tampoco hay una tendencia clara que permita deducir un comportamiento determinado de la célula. Además, claro está, las condiciones de los tratamientos no son homogéneas, un tratamiento acidificante corto implica una acidez mucho mayor del sustrato de tratamiento, mientras que los tratamientos largos implican pHs mayores.

Tabla 8.

Comparación de las varianzas de las distribuciones del número de supervivientes tras diferentes grados de inactivación de los microorganismos indicados en los sustratos referidos. Las casillas marcadas con una x indican que los tratamientos que se comparan no diferían significativamente al aplicar el test de Bartlett ($p > 0,05$).

<i>Enterococcus faecalis</i>		Peptona / ácido acético				Caldo de pollo / ácido acético				Tampón citrato			
Sustrato	Inactivación	0											
Peptona	0		2										
	2			3									
	3		x		4								
	4												
Caldo de pollo	0	x				0	2						
	2	x				x		3					
	3								4				
	4		x	x						0	2		
Citrato	0	x				x	x					3	
	2										x		4
	3				x							x	
	4				x								
<i>Listeria innocua</i>		Peptona / ácido acético				Caldo de pollo / ácido acético				Tampón citrato			
Sustrato	Inactivación	0											
Peptona	0		2										
	2			3									
	3		x		4								
	4		x	x		0	2						
Caldo de pollo	0	x				x		3					
	2	x							4				
	3			x	x					0	2		
	4											3	
Citrato	0	x				x	x						4
	2												
	3												
	4							x					
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		Peptona / ácido acético				Caldo de pollo / ácido acético				Tampón citrato			
Sustrato	Inactivación	0											
Peptona	0		2										
	2			3									
	3		x		4								
	4		x	x		0	2						
Caldo de pollo	0	x						3					
	2		x	x					4				
	3			x	x					0	2		
	4			x	x							3	
Citrato	0	x											4
	2										x		
	3										x	x	
	4												
<i>Salmonella Enteritidis</i>		Peptona / ácido acético				Caldo de pollo / ácido acético				Tampón citrato			
Sustrato	Inactivación	0											
Peptona	0		2										
	2			3									
	3				4								
	4			x		0	2						
Caldo de pollo	0	x						3					
	2			x					4				
	3			x	x					0	2		
	4											3	
Citrato	0	x											4
	2			x	x			x			x		
	3							x	x				
	4							x					

4.3 ANÁLISIS DE LA VARIABILIDAD DE LA FASE DE LATENCIA EN MICROPOBLACIONES SOBREVIVIENTES A TRATAMIENTOS ACIDIFICANTES

El propósito de esta etapa de la Tesis era analizar cómo varía la fase de latencia cuando los microorganismos en estudio se someten a una preadaptación en TSB a pHs 7 y 5, posteriormente se exponen a tratamientos acidificantes y las células supervivientes se diluyen sucesivamente en TSB a los pHs antes indicados y se inoculan dos diluciones decimales consecutivas en dos microplacas, cada uno de 100 pocillos, confiando que en cada pocillo de una de las placas exista, probablemente, una célula. Se registran cada cierto tiempo las absorbancias generadas al multiplicarse los microorganismos y, finalmente, se calcula la fase de latencia de *E. faecalis*, *L. innocua*, *P. fluorescens* y *S. Enteritidis* de acuerdo con distintos supuestos: que el inóculo inicial corresponda a una célula (1C), que el número de células por pocillo siga una distribución de Poisson (P) o Poisson Truncada (PT).

4.3.1 Crecimiento microbiano en TSB a diferentes pHs

En un primer momento, se analizaron las condiciones que permitían el crecimiento de los microorganismos utilizados en esta tesis a 20°C, ajustados a diferentes pHs con HCl tal y como se expuso en el apartado 4.3.1. A modo de ejemplo, se muestran los resultados referentes a *L. innocua* en la Figura 38. No se detectó el crecimiento de este microorganismo a pHs de 4,42 e inferiores, mientras que a pH 4,64 y por encima siempre se observó crecimiento. Nótese que son curvas de crecimiento a partir de inóculos de entre 10^2 y 10^3 ufc/pocillo y que los valores mostrados en las gráficas son absorbancias generadas por la turbidez desarrollada por el cultivo. Es decir, cuando la absorbancia comienza a incrementarse no indica el tiempo transcurrido durante la fase de latencia, sino una multiplicación suficiente para alcanzar tasas del orden de 10^6 - 10^7 ufc por pocillo (véase más adelante). Así, a pHs 4,65 *L. innocua* precisó más de 100 horas a 20°C para que el cultivo se multiplique lo suficiente para llegar a esas tasas, mientras que a pH 5,89, ese tiempo se redujo a menos de la mitad. Debe señalarse que no puede afirmarse categóricamente que *L. innocua* no crezca a pH 4,42, sino que en las condiciones del ensayo el microorganismo no desarrolló turbidez. Es decir, cabe la posibilidad de que se haya multiplicado, pero no lo suficiente para llegar a la tasa microbiana que genera turbidez.

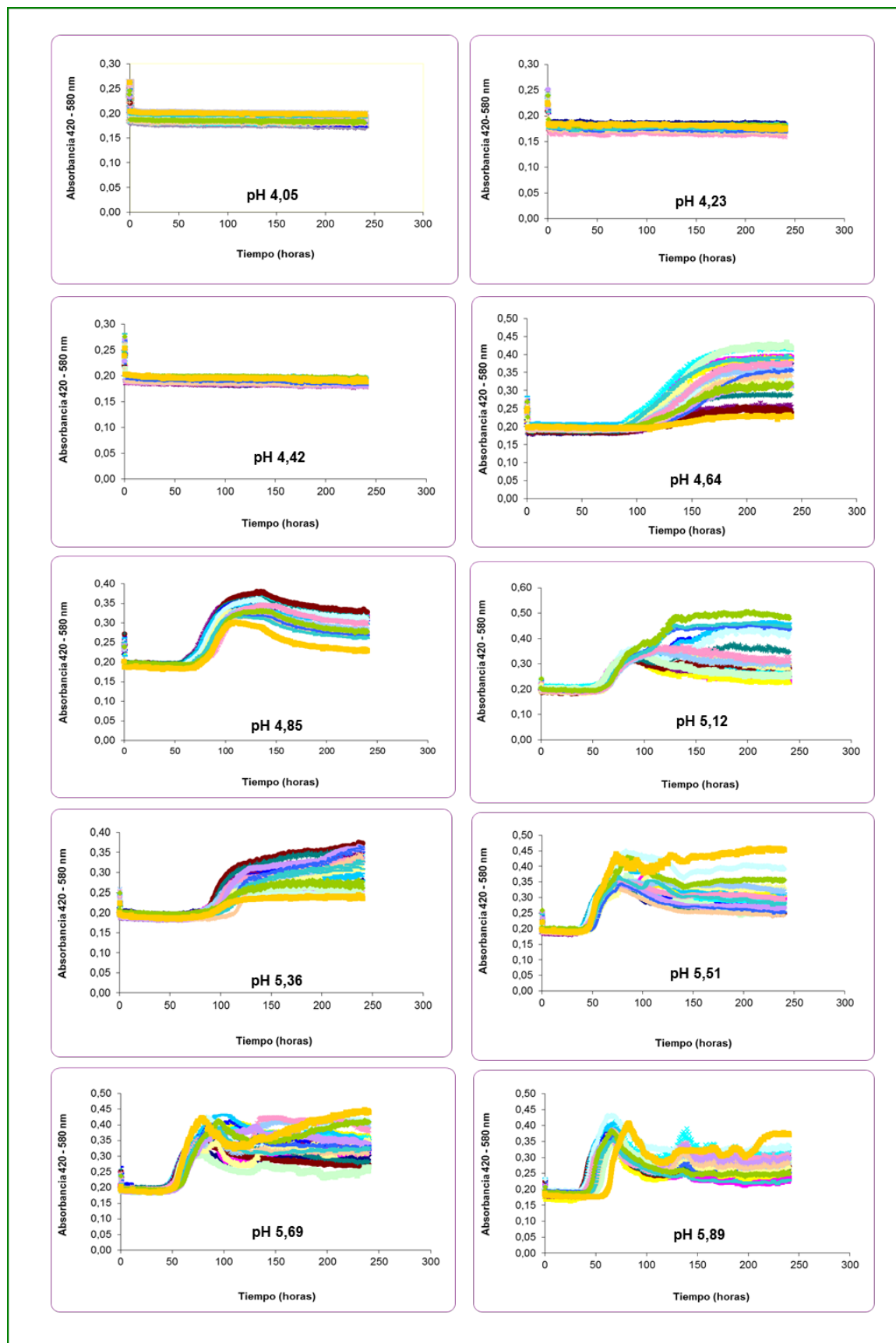


Figura 38. Curvas de crecimiento de *Listeria innocua* en TSB/HCl (0,5 N) a pH entre 4,02 y 5,89 e incubadas a 20°C.

De todas maneras, como el objetivo de estos experimentos era conocer qué pH permitía la generación de turbidez en el Bioscreen como un paso previo para la ulterior determinación de la fase de latencia a un determinado pH en ese mismo equipo y condiciones, el diseño experimental debe considerarse correcto. De hecho, el pH mínimo que se estableció para la determinación de la fase de latencia fue de 5,0.

Los resultados expuestos en la Figura 38 parecen indicar que la exposición de *L. innocua* a pHs 4,05 y 4,42 sobrepasa la tolerancia del microorganismo a la acidez y no permite la activación de los mecanismos fisiológicos de protección ante tales condiciones acidificantes.

A partir de pH 4,64 se observa crecimiento y conforme aumenta el pH, este crecimiento es más rápido, como se aprecia en la Figura 38. Nótese que estos pHs son todavía notablemente ácidos y que la célula tiene que ajustar sus mecanismos de compensación de la acidez extracelular para poder mantener unas condiciones intracelulares compatibles con su metabolismo y multiplicación. Así, es de entender que la fase de latencia, conforme el pH se aleje del óptimo de crecimiento, sea más prolongada y la tasa específica de crecimiento menor. Sin embargo, esta fase no sólo depende de las condiciones del sustrato, también depende de otros factores, como la temperatura de incubación y el estado fisiológico de la cepa (Métris y col 2006).

Los otros microorganismos demostraron un comportamiento similar por lo que no se detallan aquí. En resumen, no se detectó la multiplicación en las condiciones del ensayo (20°C en el Bioscreen) a pH 4,58 (*P. fluorescens*), 4,62 (*Salmonella Enteritidis*) y 4,47 (*E. faecalis*), generándose la suficiente turbidez a pHs de 4'84, 4'69 y 4'78 respectivamente. En este contexto cabe citar algunos valores de pH límites de crecimiento de otros autores, aunque llevados a cabo en condiciones experimentales no idénticas a las aquí descritas. Así, dos Santos (2007) afirmó que *S. typhimurium* y *L. monocytogenes* crecían a $\text{pH} \geq 4,5$ a 22°C, algo similar a la publicado por Samelis y col (2003), quienes observaron crecimiento de esas mismas especies a pH 4,4 a 30°C. Por su parte, Janssen y col. (2007) aseguraron que el pH límite de crecimiento de *L. innocua* era $\geq 3,5$ a temperatura ambiente; en cambio Koutsoumanis y col. (2003) determinaron la tolerancia al estrés ácido en *L. monocytogenes* a ese mismo (pH 3,5) a 30°C. Sin embargo, *P. fluorescens* requiere $\text{pH} \geq 4,5$ para su crecimiento (Diaz, 2011).

4.3.2 Estimación del número bacterias (N_d) en el tiempo de detección (T_d)

Para determinar la fase de latencia con el Bioscreen es imprescindible determinar previamente la cantidad de bacterias que generan una turbidez arbitrariamente elegida (0,25 unidades medidas en las condiciones del Bioscreen en este caso) y la tasa máxima específica de crecimiento:

$$Lag = T_d \left[\frac{\ln(N_d) - \ln(N_0)}{\mu_{max}} \right] \quad (25)$$

Para calcular la turbidez que genera una determinada tasa microbiana $\ln(N_d)$ se hicieron curvas de calibración diluyendo un cultivo bien desarrollado en medio de cultivo estéril hasta concentraciones microbianas cuyas absorbancias debían caer dentro de un intervalo que permite calcular una recta de regresión en la que pueda extrapolarse la cantidad de microorganismos que generan turbidez de 0,25 unidades de absorbancia en la banda 420 - 580 nm de longitud de onda. Se hicieron dos curvas de calibración para cada microorganismo, una a pH neutro y otra a un pH ligeramente ácido que permitía el crecimiento de las cuatro bacterias ensayadas por si al acidificar el medio, su color de base pudiera cambiar y al desarrollarse el microorganismo correspondiente, pudiera modificarse el número de células que generan la turbidez establecida como umbral de detección.

En las Figuras 39 y 40 se muestran las curvas de calibración resultantes a pHs de 7,20 y 5,10 respectivamente. A la vista de los resultados se deduce que no es fácil obtener una buena linealidad entre el logaritmo natural de la concentración microbiana y la turbidez de esa concentración desarrollada. Piénsese que las bacterias crecen, con mucha frecuencia, agrupadas y con las tasas tan considerables (millones de unidades formadoras de colonias) necesarias para una mínima turbidez (las 0,25 unidades establecidas arbitrariamente), el número real de microorganismos existentes puede ser diferente en unas condiciones u otras ya que es posible que las agrupaciones microbianas estén formadas a veces por un número mayor de microorganismos y en otras por menos. Así se entiende que una turbidez determinada pueda rendir recuentos distintos. Además, el manejo a la hora de diluir, agitar los cultivos, el pipeteo, etc., puede conllevar unos errores que, al acumularse o compensarse, podrían explicar la relativamente escasa linealidad de las absorbancias y los recuentos y las diferencias

entre las curvas de calibración a los dos pHs analizados, según puede comprobarse en la Tabla 9. No obstante, debe considerarse que el valor que pretende obtenerse con estos experimentos, la concentración microbiana cuando el cultivo alcanza una densidad óptica en la banda de longitudes de onda de 420 a 580 nm es de 0,25 unidades, va a ser un único valor que se utilizará siempre por lo que, aunque pueda esgrimirse que no es del todo correcto, como va a utilizarse siempre ese valor, el error cometido será siempre el mismo y, al menos, las diferencias entre las fases de latencia calculadas sean veraces, así como la variabilidad de la fase de latencia, que para esta tesis es más importante que una medida exacta de la fase de latencia de las bacterias.

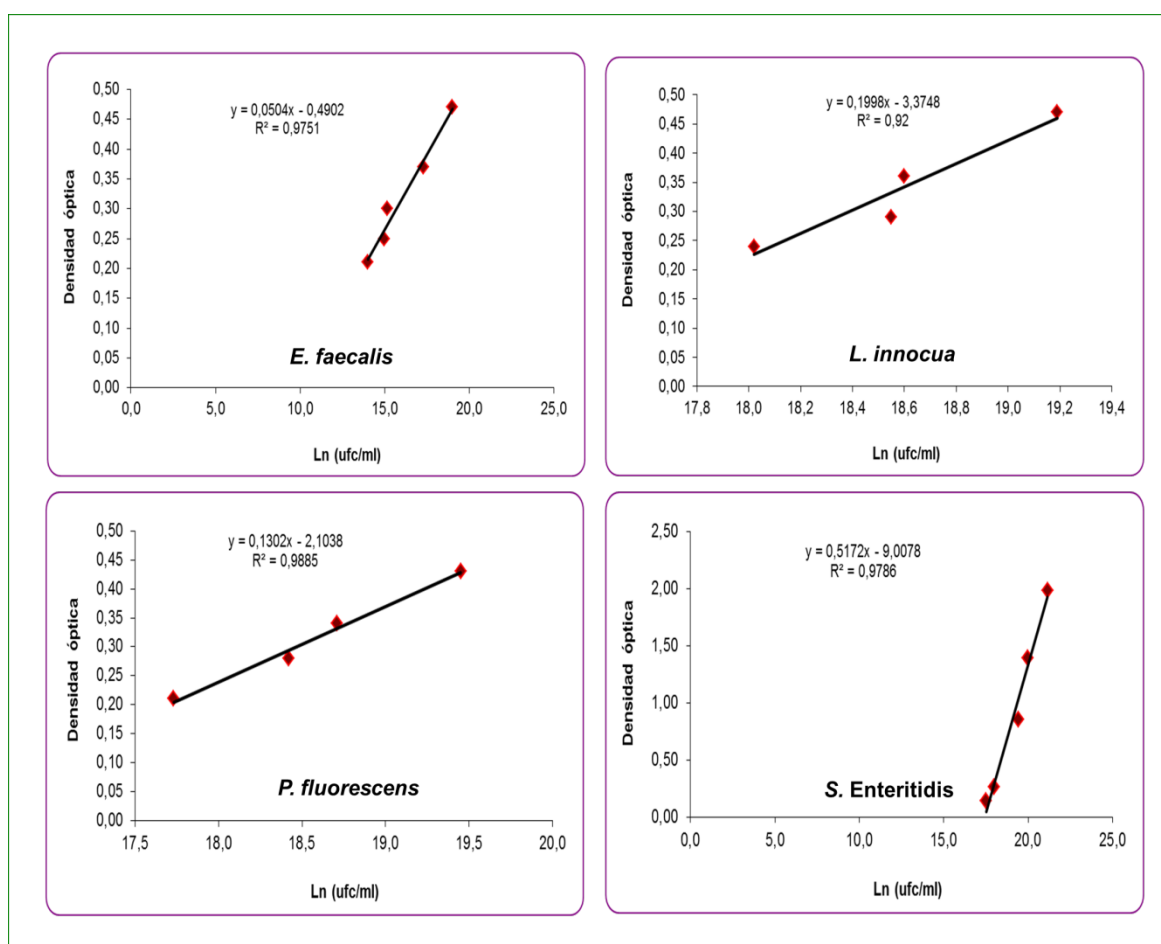


Figura 39. Efecto de la concentración microbiana en la turbidez generada por diversos microorganismos en el Bioscreen en la banda de longitud de onda de 420 a 580 nm en TSB a pH en torno a 7,26 a 20°C.

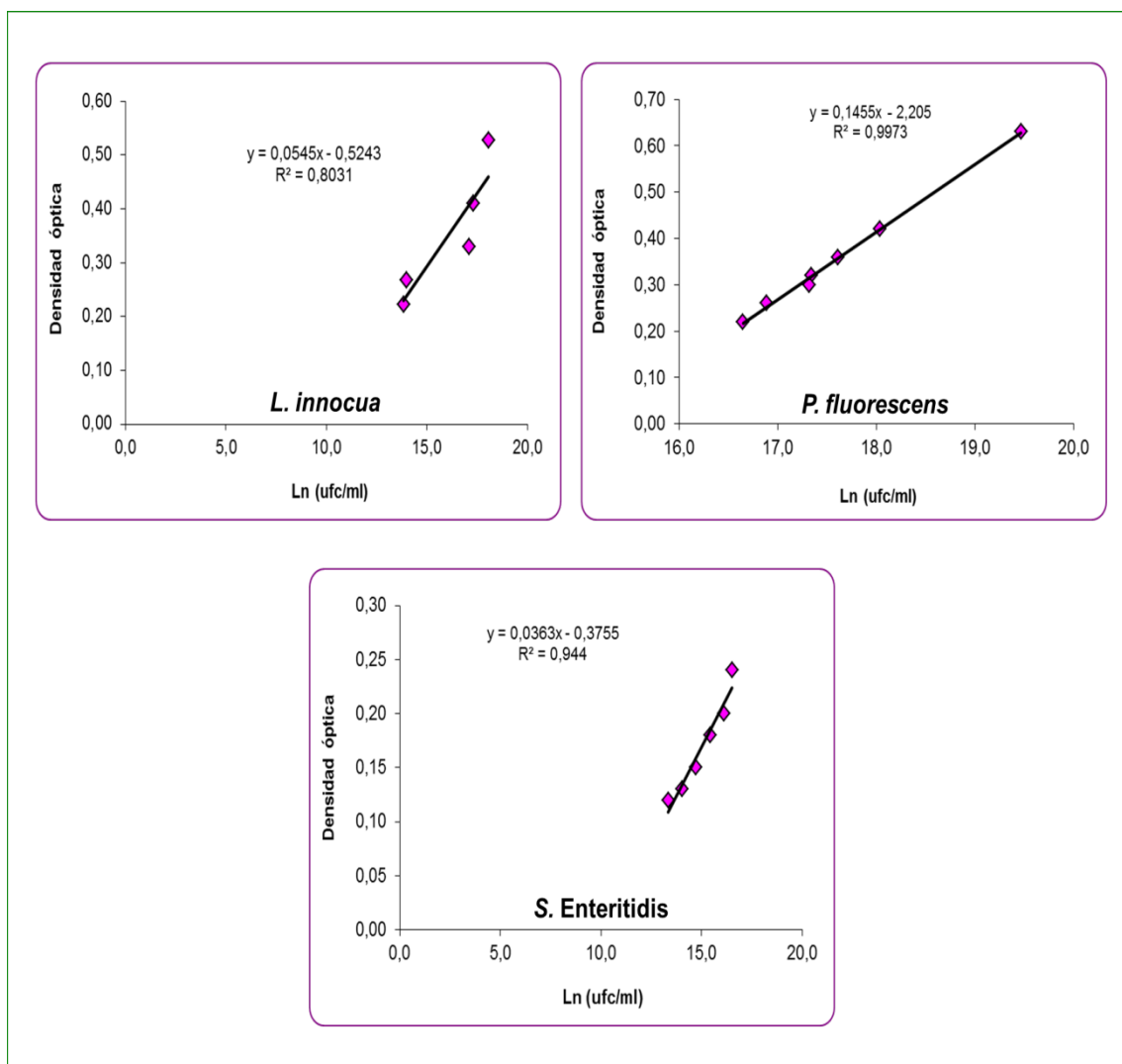


Figura 40. Efecto de la concentración microbiana en la turbidez generada por diversos microorganismos en el Bioscreen en la banda de longitudes de onda de 420 a 580 nm en TSB a pH cercanos a 5,12 a 20°C.

Tabla 9.

Ecuaciones de las rectas de regresión ajustadas por el método de los mínimos cuadrados, que permiten estimar la concentración microbiana (N_d , ufc/ml) a una densidad óptica de 0,25 unidades de absorbancia en las condiciones de trabajo de esta tesis (véanse las Figuras 39 y 40).

Microorganismo y pH del TSB	Ecuación de la pendiente	Valores de x ($Ln N_d$) cuando y (Abs) = 0,25	N_d (ufc/ml)
<i>E. faecalis</i> TSB/pH 7,35	$y = 0,0504x - 0,4902$	14,69	$2,39 * 10^6$
<i>L. innocua</i> TSB/pH 7,44	$y = 0,1998x - 3,3748$	18,14	$7,57 * 10^7$
<i>L. innocua</i> TSB/pH 5,09	$y = 0,0392x - 0,3021$	14,08	$1,31 * 10^6$
<i>P. fluorescens</i> TSB/pH 7,26	$y = 0,1302x - 2,1038$	18,08	$7,10 * 10^7$
<i>P. fluorescens</i> TSB/pH 5,17	$y = 0,1455x - 2,205$	16,87	$2,13 * 10^7$
<i>S. Enteritidis</i> TSB/pH 7,32	$y = 0,5172x - 9,0078$	17,90	$5,94 * 10^7$
<i>S. Enteritidis</i> TSB/pH 5,40	$y = 0,0363x - 0,3755$	17,23	$3,04 * 10^7$

Siempre que se llevan a cabo estas experiencias debe asumirse este grado de incertidumbre puesto que, experimentalmente, no se ha diseñado otra posibilidad mejor. A este respecto, Guillier y col. (2005) siguieron una alternativa algo distinta. Observaron una concentración de *L. monocytogenes* de aproximadamente $1,8 * 10^7$ ufc/pocillo en el umbral de detección establecido por ellos, que no es exactamente igual al utilizado en este trabajo, ya que medían el tiempo de detección cuando la absorbancia aumentaba 0,05 unidades en sus condiciones experimentales (similares a las seguidas aquí). De esta manera se pretenden anular las variaciones, a veces observadas, del color de base del medio de cultivo, fruto de múltiples factores, desde un diferente proveedor, hasta un tratamiento en el autoclave más intenso, un diferente pH, etc., que pueden generar diferencias de décimas de unidades de absorbancia en el registro del Bioscreen.

No obstante, este método deja cierto grado de incertidumbre en su exactitud a la hora de cuantificar la cantidad de microorganismos en el tiempo de la detección precisamente debido a las diferentes absorbancias que hayan podido generarse fruto de la combinación de la turbidez (microorganismos) y el color de base del medio, por lo que la autora de esta Tesis se decantó por la técnica detallada más arriba en vez de la variación seguida por Guillier y col. (2005).

4.3.3 Cálculo de la tasa de máximo crecimiento (μ_{max}) con el Bioscreen

El otro parámetro necesario para el cálculo de la fase de latencia con el Bioscreen es la tasa específica de máximo crecimiento según se desprende de la ecuación (25)

$$Lag = T_d \left[\frac{\ln(N_d) - \ln(N_0)}{\mu_{max}} \right] \quad (25)$$

La forma tradicional de calcular este parámetro cinético de crecimiento microbiano es mediante recuentos de células viables a lo largo del tiempo durante el crecimiento microbiano para obtener una curva sinusoide, cuyo tramo central, entre las dos zonas más curvadas, una previa y otra posterior en el tiempo, puede asumirse a una recta, cuya pendiente es la tasa de máximo crecimiento. Obviamente, esta forma de calcular μ_{max} no es adecuada cuando se trabaja con absorbancias, ya que el umbral de detección de turbidez, es decir, el número mínimo de unidades formadoras de colonia, es del orden de millones, cuando el crecimiento exponencial ya está en su fase de paulatina ralentización. Quizás la Figura 41 ayude a comprender este extremo.

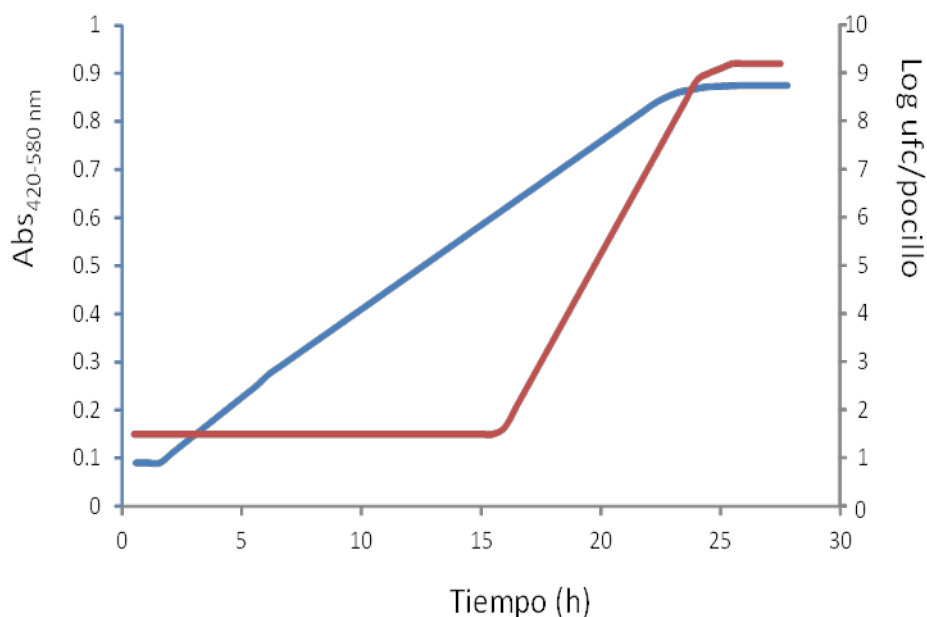


Figura 41. Comparación de las curvas de crecimiento modelo de un microorganismo generado con recuentos (azul) y con medidas de la turbidez (rojo).

Es evidente que las pendientes observadas en las dos curvas son muy diferentes por lo que no puede determinarse la μ_{max} directamente con la turbidez desarrollada. La forma de determinar este parámetro ya se ha descrito en la sección 4.3.3 de acuerdo con el método de Robinson y col. (1998), mediante el cálculo de los tiempos de detección (tiempo necesario para alcanzar una absorbancia de 0,25 unidades a en la banda 420 - 580 nm) de diferentes concentraciones microbianas (determinadas mediante recuentos). La μ_{max} se calcula tras estimar por mínimos cuadrados la recta de regresión que une los tiempos de detección calculados; el valor absoluto de la inversa de la pendiente de dicha recta es μ_{max} . Esta técnica ha sido validada por Augustin y Carlier (2000) al comparar varios métodos (recuentos, microscopia, citometría, etc.) con el método combinado de datos de DO y recuentos de células viables, dando como resultado estimaciones de tiempo de latencia similares.

En las Figuras 42 y 43 se muestran las representaciones gráficas de los tiempos de detección de diferentes concentraciones de las bacterias en estudio a pHs en torno a 5 y 7 a 20°C.

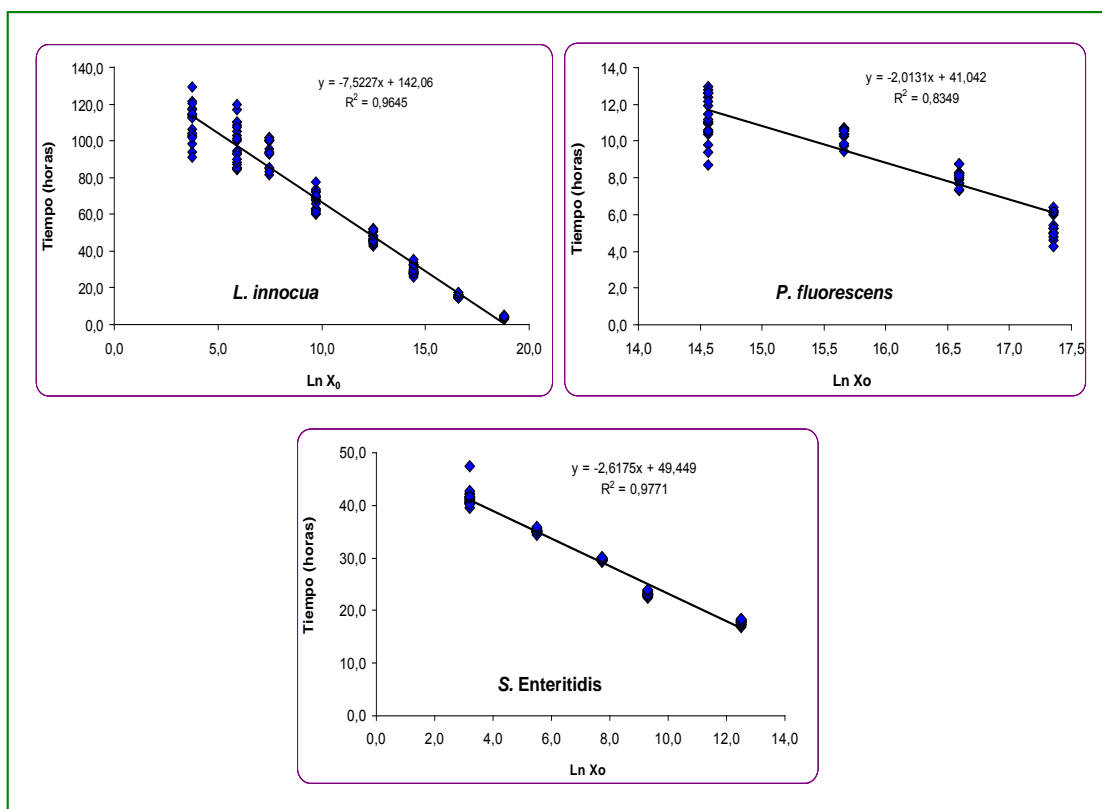


Figura 42. Efecto de la concentración del inóculo en el tiempo de detección (T_d) de los microorganismos en estudio en TSB a 20°C y un pH en torno a 5.

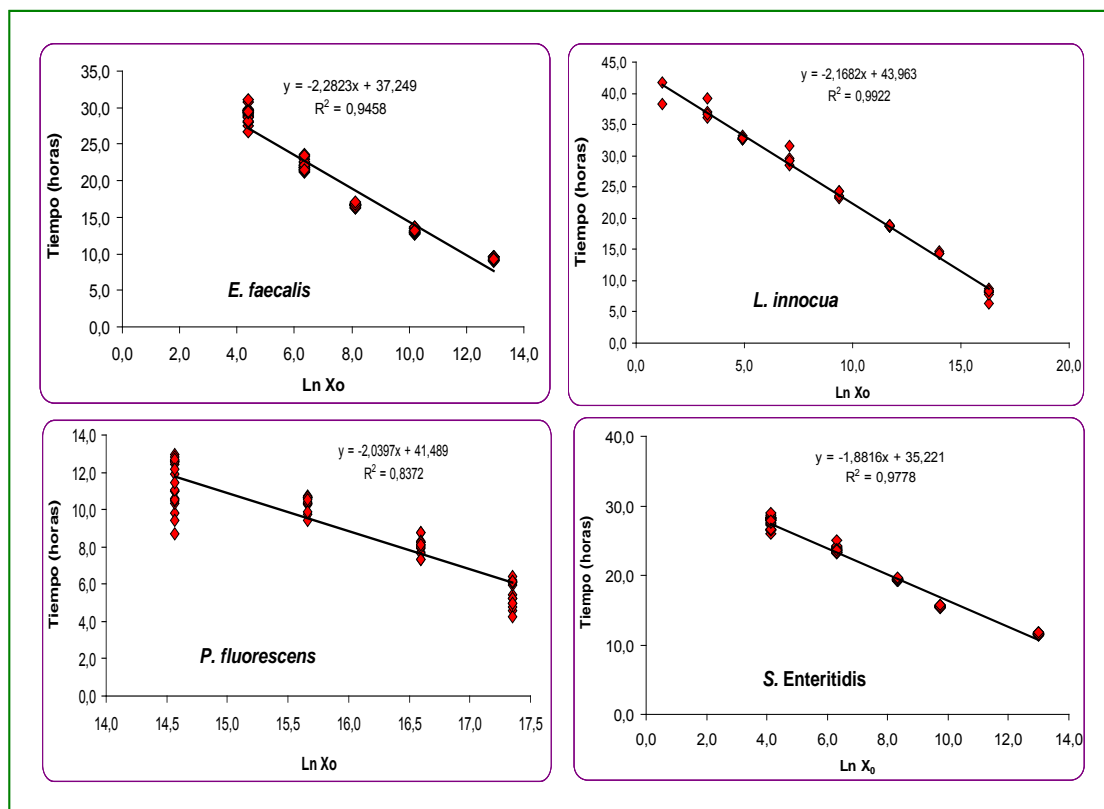


Figura 43. Efecto de la concentración del inóculo en el tiempo de detección (T_d) de los microorganismos en estudio en TSB a 20°C y un pH en torno a 7.

La Figura 42, no muestra la representación gráfica de los T_d en *E. faecalis* a pH ácido porque este microorganismo, en esas condiciones, provocaba la presencia de un sedimento o precipitado que alteraba la medida de la turbidez, tal como se muestra en la Figura 44. Dicha interferencia no se observó a pH neutro. El Bioscreen, en condiciones normales, mide la suspensión celular que presenta turbidez cuando un haz luminoso pasa a través de la suspensión bacteriana, produciéndose una reducción en la cantidad de luz que la atraviesa, ya que se difracta o refleja; la luz que no logra llegar al sensor habrá sido desviada por las bacterias, por lo que, la absorbancia será proporcional al número de “partículas” en suspensión. Sin embargo, si las células forman biofilms, en la superficie o en la base del medio de cultivo líquido o se forma un precipitado, la opacidad formada impide que la luz se transmita y el Bioscreen va a considerarla “turbidez”; es entonces cuando el equipo interpreta que las muestras tienen concentraciones elevadas de células cuando, en realidad, no es seguro que la absorbancia de luz se deba a células viables. *E. faecalis* es una bacteria capaz de sobrevivir en condiciones estresantes. Al parecer son capaces de adaptarse y reaccionar a cambios ambientales y crear tolerancia al estrés ácido (McMeekin y col., 2002; Swinnen y col., 2004). Investigaciones realizadas por Chung y col. (2006) indican que esta adaptabilidad fisiológica puede expresarse tanto en medio sólido como líquido, formando micro-colonias y/o biopelículas visibles, probablemente semejantes a las mostradas en la Figura 44, mecanismo que también contribuye a la tolerancia y supervivencia ante cualquier tipo de tratamiento antimicrobiano.

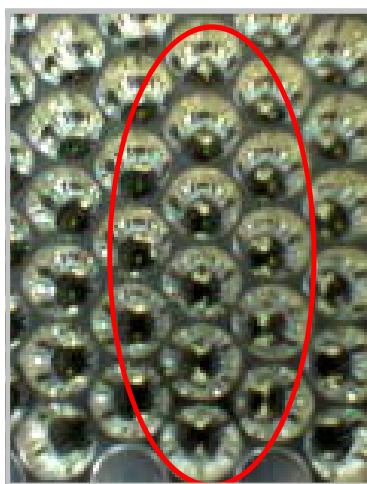


Figura 44. Detalle de una microplaca de Bioscreen con *Enterococcus faecalis* en TSB/HCl (0,5 N) a pH 5'12, el óvalo rojo encierra los pocillos con un precipitado de color blanquecino.

Al inicio de las experiencias se pensó que la formación de estos precipitados pudo deberse a un error metodológico durante la preparación de las muestras, pero tras repetidos ensayos y modificaciones a la metodología, el resultado final no fue satisfactorio, razón por la que no se presentan los cálculos de los parámetros cinético y, consecuentemente tampoco se estimó la fase de latencia de *E. faecalis* en TSB acidificado hasta pH 5 con HCl (0,5 N).

La Tabla 10 muestra los valores de las tasas de μ_{max} calculadas a partir de los tiempo de detección, que, en realidad, no es más que la suma de la fase de latencia más los tiempos de duplicación del inóculo necesarios para alcanzar una turbidez medible ($\sim 10^7$ células/pocillo) (Métris y col., 2006). Cuanto mayor sea el inóculo, menor será el número de duplicaciones necesarias y el tiempo de detección se acorta como se observa en las Figuras 42 y 43. Como era de esperar, las μ_{max} en pH ácido eran menores que en los neutros, excepto, sorprendentemente, para *P. fluorescens*, cuya tasa fue prácticamente igual a ambos pHs.

Tabla 10.

Tasas máximas de crecimiento (μ_{max}) calculadas experimentalmente en TSB a 20°C en el Bioscreen a diferentes pHs.

Microorganismos y pH del TSB	Ecuación	μ_{max} (h ⁻¹)	R^2	SE
<i>E. faecalis</i> TSB/pH 7,40	$y = -2,2823x + 37,249$	0,4382	0,9458	0,0550
<i>L. innocua</i> TSB/pH 7,42	$y = -2,1682x + 43,963$	0,4612	0,9922	0,0287
<i>L. innocua</i> TSB/pH 5,01	$y = -7,5227x + 142,06$	0,1329	0,9645	0,1163
<i>P. fluorescens</i> TSB/pH 7,36	$y = -2,0397x + 41,489$	0,4903	0,8372	0,1142
<i>P. fluorescens</i> TSB/pH 5,17	$y = -2,0131x + 41,042$	0,4967	0,8349	0,1137
<i>S. Enteritidis</i> TSB/pH 7,30	$y = -1,8816x + 35,221$	0,5315	0,9778	0,0288
<i>S. Enteritidis</i> TSB/pH 5,34	$y = -2,6175x + 49,449$	0,3820	0,9771	0,0405

μ_{max} : Tasa de máximo crecimiento

R^2 : Coeficiente de determinación

SE: Error estándar de μ_{max}

La precisión en el cálculo de la μ_{max} es decisiva para, posteriormente, estimar con fiabilidad las fases de latencia, como puede deducirse de la observación de la Ecuación (25). Un pequeño fallo en la estimación, puede provocar errores considerables. No obstante, su precisión es relativa, ya que, de acuerdo con los estudios microbiológico matemático de Métris y col. (2006), en condiciones favorables el error es del 5% y a medida que el entorno se hace más adverso el error aumenta hasta un 10% e incluso más, sin considerar errores propios de los operarios. A pesar de esta advertencia, los mismos autores concluyen que el cálculo de la fase de latencia mediante la antedicha ecuación, utilizando las μ_{max} son una buena aproximación.

4.3.4 Fases de latencia después de diferentes tratamientos acidificantes

Investigar la fase de latencia de microorganismos no es fácil. Requiere un exhaustivo control de muchos factores, ya que son innumerables los que la afectan. La “historia” del microorganismo o de la población puede ser decisiva, así como cualquier condición ambiental que le rodee, desde la composición del sustrato donde crecerá, hasta la atmósfera donde se encuentra o la temperatura, sin olvidarnos de la cantidad de microorganismos que forman el inóculo. Entre estos factores, en esta Tesis importa sobre todo el estrés ácido. Es decir, cómo afectan las condiciones -ácidas- precedentes a la fase de latencia de los microorganismos con capacidad de crecimiento tras haber estado pasado por tales condiciones. En este contexto existen algunas evidencias (McMeekin y col., 2002; McMeekin y Ross, 2002; Swinnen y col., 2004) que señalan que los factores que más condicionan el crecimiento de microorganismos, estereotipados en células de *E. faecalis*, en cualquier tipo de sustrato son la historia fisiológica de la población y pre-adaptaciones a las condiciones perjudiciales como medios pobres en nutrientes y variaciones ambientales (acidez – neutralidad - acidez); la manera que han encontrado estos microorganismos para enfrentarse al estrés es modificando sus procesos metabólicos, generando nuevas cepas más tolerantes al estrés ácido. Investigaciones realizadas por Chung y col. (2006), indican que esta variabilidad fisiológica en las nuevas cepas de *E. faecalis* (in vivo) pueden también expresarse en medios de cultivo líquido, formando micro-colonias y/o biopelículas visibles mecanismo que también puede contribuir a la supervivencia ante cualquier tipo de tratamiento antimicrobiano (probablemente, semejante a la Figura 44).

En la primera parte de esta Tesis se ha analizado la inactivación microbiana mediante acidificación. Ahora se pretende estudiar el comportamiento de los microorganismos viables (supervivientes) a dichos tratamientos. Es de esperar que las bacterias que pasan por una situación estresante, que ha inactivado completamente a unos porcentajes muy elevados de la población, hayan sufrido daños y que estos daños necesiten de una reparación para que ese microorganismo demuestre su capacidad de multiplicarse. Ese tiempo, más el necesario para duplicarse, es lo que se considera en esta Tesis la fase de latencia. También parece razonable pensar que cuanto más ácido haya sido el ambiente por el que ha pasado la bacteria o más tiempo haya estado sometida a las condiciones acidificantes, más probable será que esté dañada o más daños habrá sufrido y, por tanto, más probable será que su fase de latencia se prolongue más y más al encontrarse en un ambiente que permita su reparación y multiplicación. Por tanto, para cumplir con el objetivo planteado, se procedió a someter a tratamientos acidificantes de diversa intensidad a los microorganismos en estudio según se muestra en la Tabla 11. Los tratamientos se calcularon de acuerdo con los parámetros de inactivación (valores D_{pH} y z_{pH}) mostrados en la Tabla 5. Los pHs mostrados en la Tabla 11 son los determinados tras la esterilización de una alícuota que se trató exactamente igual que el medio empleado para el tratamiento acidificante. Una vez determinado el pH, se recurrió a las ecuaciones de la Figura 30, en las que se muestran las gráficas necesarias para calcular el valor z_{pH} , para estimar el tiempo necesario para lograr las reducciones decimales esperadas. Dichos tiempos se plasman en la Tabla 11 junto a la reducción decimal esperada de los tratamientos acidificantes y los pHs de incubación posteriores para determinar las fases de latencia de células individualizadas de los microorganismos en estudio.

Conociendo la concentración del inóculo utilizado para la inactivación y la inactivación esperada, se estaba en disposición de realizar las diluciones oportunas en las muestras tratadas de intentar inocular una célula por pocillo del Bioscreen. De esta manera, y con la ayuda de la Ecuación (25) puede calcularse la fase de latencia de células individualizadas en las condiciones del estudio.

Además, puede estimarse la variabilidad de dicha fase de latencia gracias a que en cada experimento realizado en el Bioscreen se inoculaban dos placas -cada una con 100 pocillos o muestras- con dos diluciones distintas para casi garantizar que, al menos una de las placas, contenía un número suficiente de muestras con una sola célula en el volumen inoculado (300 μ l), que permite el análisis de la variabilidad mediante la estimación de la desviación estándar de la distribución obtenida, para después, a partir de dicho valor, calcular los parámetros definitorios (Ecuaciones 29 y 30) de una distribución gamma (Ecuación 28).

Tabla 11.

Tratamientos acidificantes aplicados para analizar la fase de latencia de células individuales en el Bioscreen a 20°C. Se muestran los diferentes pHs de incubación en este equipo.

Microorganismo	pH de inactivación	Tiempo de tratamiento (min)	Inactivación esperada (-log ufc/muestra)	pH de incubación en Bioscreen a 20°C
<i>E. faecalis</i>	7,44	0	0	7,44
	3,20	15	2	7,30
	3,20	22	3	7,34
	3,15	19	4	7,40
<i>L. innocua</i>	7,42	0	0	7,42
	3,57	53	2	7,22
	3,23	19	3	7,24
	3,32	37	4	7,21
	5,17	0	0	5,17
	3,29	16	2	5,27
	3,28	24	3	5,27
	3,26	29	4	5,17
<i>P. fluorescens</i>	7,25	0	0	7,25
	3,75	4	2	7,36
	3,88	18	3	7,27
	3,92	34	4	7,22
	5,17	0	0	5,17
	4,08	64	2	5,14
	4,09	104	3	5,14
	3,92	11	4	5,07
	7,30	0	0	7,30
	3,50	13	2	7,23
<i>S. Enteritidis</i>	3,51	20	3	7,35
	3,45	19	4	7,21
	5,20	0	0	5,20
	3,54	15	2	5,22
	3,54	23	3	5,24
	3,62	47	4	5,27

Mackey (2000) indica que la aplicación de cualquier tratamiento inactivante ocasiona lesiones en las células que pueden o no permitir la sobrevivencia de la célula. En esta diatriba entre puede o no puede sobrevivir, subyace la aceptación de una variabilidad que, en el caso de las supervivientes, implica otra variabilidad, la de los daños infligidos en dichas células durante la acidificación. Parece lógico pensar que no todas las células respondan por igual al tratamiento y que unas estén más dañadas que otras, con lo que, si son viables, unas tardarán más y otras menos tiempo en la reparación de los daños y en demostrar su capacidad de multiplicación. En suma, sus fases de latencia serán variables. La variabilidad del comportamiento individual de las células microbianas está asociada con múltiples factores según analizó Aguirre y col. (2013) entre ellos algunos que pueden y deben controlarse, como por ejemplo el estado fisiológico celular previo al tratamiento estresante. Así, las células en fase estacionaria son más resistentes que las que se encuentran en la fase exponencial (Métris y col., 2006). En este trabajo se cuidó especialmente la homogeneidad del proceso de reactivación microbiana desde la suspensión madre, mantenida en congelación, hasta el tratamiento acidificante (véase 3.5.1) para evitar que existieran interferencias metodológicas que sesgaran la variabilidad que se supone inherente a las células.

4.3.5 Cálculo de la fase de latencia

Una vez inoculados los 100 pocillos de cada una de las 2 microplacas del Bioscreen con dos diluciones diferentes de las muestras tratadas de acuerdo con lo indicado en la Tabla 11, se mantuvo el cultivo a 20°C durante el tiempo necesario para que se sobrepasase el valor arbitrario de absorbancia, 0,25 unidades, arbitrariamente establecido; este tiempo se estimó en, al menos, cuatro veces más que el tiempo de detección más rápido, es decir, el de la primera muestra que alcanzó la absorbancia de 0,25 unidades. La determinación del tiempo de detección se hizo construyendo una recta de regresión con los tiempos transcurridos desde la inoculación y las absorbancias generadas en el intervalo 0,22 a 0,28. La interpolación del valor 0,25 unidades de absorbancia en las rectas resultantes (una para cada muestra) daba el valor T_d , como se mostró en la Figura 15. Préstese atención de nuevo a la Ecuación 25:

$$Lag = T_d - \left(\frac{\ln(N_d) - \ln(N_0)}{\mu_{\max}} \right)$$

Los elementos que la componen son el tiempo de detección (T_d), que va a variar de unas muestras a otras, el número de microorganismos que generan la turbidez de 0,25 unidades (N_d), que será constante para cada bacteria y pH, el inóculo, supuestamente 1 célula, (N_0), y μ_{max} , previamente calculado (véase la Tabla 10) y que se considera constante para una temperatura determinada, en este caso 20°C.

Por tanto, parece que la fase de latencia solo dependerá del tiempo de detección. Si se analiza la ecuación precedente, ¿qué significa el sustraendo? En realidad representa el tiempo que tarda N_0 en llegar a N_d , es decir, el tiempo necesario para que 1 célula se duplique, sus “hijas” lo hagan de nuevo y sus “nietas” otra vez hasta completar el número de generaciones necesario para que la turbidez sea manifiesta y alcance las 0,25 unidades en las condiciones experimentales. Por consiguiente, si consideramos que en todos los pocillos donde se observó crecimiento había una sola célula, la afirmación que encabeza este párrafo (la fase de latencia solo depende del tiempo de detección) es cierta y la distribución de frecuencias de los tiempos de detección será idéntica a la distribución de frecuencias de las fases de latencia, solo que desplazada hacia la derecha, porque el tiempo de detección será la fase de latencia más los tiempos necesarios para que una célula genere una población cuya turbidez es 0,25 unidades, y ese tiempo es constante. Esta forma de proceder y esta asunción de que en todos los pocillos se supone que hay una sola célula es una práctica habitual entre los investigadores que trabajan con fases de latencia y el Bioscreen (McKellar y Knight, 2000; Robinson y col., 2001; Guillier y col., 2005). No obstante, como ya se ha dicho en la sección 3.8.2.2, existe una herramienta matemática a disposición de los investigadores que predice el número más probable de células viables en una serie de muestras en función del número de muestras donde se haya observado crecimiento (véase la Tabla 4). Además, las Tablas de Poisson predicen no solo el número medio de viables por pocillo, sino también el número esperado de células en una de las muestras con crecimiento. Pueden verse unos cuantos ejemplos en la Tabla 12.

Tabla 12.

Porcentaje de muestras con un número de células viables en función del porcentaje de muestras en el que se ha detectado crecimiento de acuerdo con las predicciones de Poisson.

% de muestras con crecimineto	Nº medio de células/muestra	% de muestras con un número determinado de células viables						
		1	2	3	4	5	6	7
90	2,303	23	27	20	12	5	2	1
80	1,609	32	26	14	6	2	0	0
70	1,204	36	22	9	3	1	0	0
60	0,916	37	17	5	1	0	0	0
50	0,693	35	12	3	1	0	0	0
40	0,511	31	8	1	0	0	0	0
30	0,357	25	5	1	0	0	0	0
20	0,223	18	2	0	0	0	0	0
10	0,105	9	1	0	0	0	0	0

Con esta Tabla en la mano puede afirmarse con rigor científico cuántas muestras de las que se manejen en una experiencia contendrán 1, 2, 3, etc. número de viables, siempre en función del porcentaje de muestras en las que se apreció y no se apreció crecimiento. Pero, claro, aún persiste un problema. Sabemos cuántas muestras contienen n número de células, pero no sabemos cuál o cuáles de las que presentaron crecimiento las contienen. No obstante, puede aproximarse a la realidad, aunque no haya una certeza absoluta, si se supone que las muestras que alcanzan más deprisa la turbidez de detección son las que contienen más células. Así se procedió en este trabajo, contemplando esta segunda alternativa, asignando a las muestras más “rápidas” el inóculo predicho por Poisson. Ayudémonos con un ejemplo para entenderlo. Sea una placa de 100 pocillos en la que se ha observado crecimiento en 50 de ellos. De acuerdo con la Tabla 12, en 1 de los 50 pocillos existirían 4 células, en 3 pocillos, 3 células, en 12, 2 células y en los 35 restantes solo 1, y, claro está, el resto de los pocillos (50) no contendrían ninguna célula. Pues bien, el tiempo de detección más corto observado se le asigna a la muestra con 4 células y a la hora de calcular la fase de latencia, $\text{Ln } N_0$ se sustituiría por $\text{Ln } 4 = 1,386$. A las muestras con los tiempos de detección 2º, 3º y 4º más cortos, les corresponderían 3 células iniciales ($\text{Ln } 3 = 1,099$), a las 12 siguientes en rapidez de tiempos de detección se le asignan 2 células como inóculo ($\text{Ln } 2 = 0,693$) y el resto quedaría con una carga inicial de 1 célula ($\text{Ln } 1 = 0$). Se han incluido los logaritmos naturales de 1, 2, 3 y 4 para que se comprenda cómo afecta la presencia de 1, 2 ó 3 células más en una muestra al cálculo de la fase de latencia de esa mini-población. Piénsese que esa cifra ha de restársele al logaritmo natural del número de células en el

momento de la detección, que es del orden de 16, por lo que la fase de latencia de las muestras más rápidas, con, supuestamente, más células, serán algo más prolongadas que si se supusiera que contienen solo una célula.

Todavía se ha manejado una tercera alternativa, que se ha denominado Poisson Truncada y que fue introducida por Métris y col. (2006) para el cálculo de la fase de latencia. Recurriendo a la estadística lógica, pueden considerarse a todas las muestras por igual, pero no suponiendo que en todas hay una sola célula, sino el número medio de células por muestra predicho por la Tabla de Poisson, tal como se ha mostrado en la Tabla 12. Sígase con el ejemplo anterior; de acuerdo con dicha Tabla, el número total esperado de células en los 100 pocillos es de $35*1 + 2*12 + 3*3 + 1*4$, lo que da un total de 72. La división de esas 72 células entre los 50 pocillos que demostraron crecimiento, nos dará el número medio por pocillo o media truncada (ya que se han descartado las muestras con 0 células), es decir, 1,44, cuyo logaritmo neperiano es de 0,365.

En este trabajo se han calculado las fases de latencia con las tres alternativas. En realidad, se trata de un afinado del método de cuantificación de la fase de latencia de acuerdo con la propuesta de Baranyi y Pin (1999) (Ecuación 25). En dicha Ecuación matemática, se reemplazan los parámetros mencionados con los valores obtenidos en condiciones experimentales. Recuérdese que los valores de T_d se obtienen en el Bioscreen, el $\ln(N_0)$ se determina mediante la distribución de Poisson (P), se considera siempre 1 célula (1C) o como el número medio de células por pocillo con crecimiento o Poisson Truncado (PT), siendo $\ln(N_d)$ y μ_{max} constantes y previamente calculados experimentalmente.

Las Tablas 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 muestran las fases de latencia, y su variabilidad, tras diferentes tratamientos acidificantes que pretendían una inactivación de 0, 2, 3 y 4 ciclos logarítmicos (en adelante 0D, 2D, 3D y 4D), en TSB, a dos pHs, uno neutro y el otro ácido, a 20°C, calculadas con las tres aproximaciones que acaban de describirse.

Los resultados muestran que las fases de latencia de los cuatro microorganismos tras haber padecido estrés ácido se caracterizan por ser más largas y más variables que

las de los lotes control (0D). Además, por regla general, cuanto más intenso es el tratamiento acidificante, la media de la fase de latencia es mayor.

Es necesario destacar que las fases de latencia más cortas tanto a pH neutro como ácido se observaron en *Salmonella*, mientras que las más prolongadas a pH neutro corresponden a *P. fluorescens*, mientras que a pH ácido, también le correspondieron a esta bacteria cuando no había sido sometida a estrés inactivante previo, mientras que *L. innocua* fue la más lenta en comenzar la multiplicación cuando se sometió a inactivación, demostrándose que necesitaba más reparaciones. Recuérdese que no se cuenta con las fases de latencia de *E. faecalis* en pH ácido porque no pudieron determinarse experimentalmente en el Bioscreen al formarse un precipitado o biofilm que interfería con las lecturas del equipo. Es curioso resaltar que las fases de latencia de *P. fluorescens* fueron bastante similares a pH neutro y ácido, mientras que en las otras dos bacterias, las fases de latencia eran más cortas a pH neutro que en el ácido, como era de esperar.

Tabla 13.

Fases de latencia de células individuales o micropopulaciones de *Enterococcus faecalis* en TSB a pH ~7,37 supervivientes a diferentes tratamientos acidificantes. Los datos reseñados se han utilizado para ajustar las distribuciones gamma (véase más adelante) porque eran los que más se acercaban a una célula por pocillo.

Nº total de muestras	Nº de muestras con crecimiento	Inactivación lograda (-log ufc/muestra)	Nº promedio de células por muestra ^a	Fases de latencia calculadas con un inóculo de 1 célula/muestra		1 célula			Distribución de Poisson			Distribución de Poisson Truncada		
				Valor mínimo	Valor máximo	Fase de latencia (h)			Fase de latencia (h)			Fase de latencia (h)		
						Media	Sd (h)	CV (%)	Media	Sd (h)	CV (%)	Media	Sd (h)	CV (%)
50	47	0,0	2,8	1,8	5,6	3,9	0,97	24,4	6,1	0,43	7,0	6,4	0,97	15,0
50	44	0,0	2,1	2,9	11,2	8,2	1,56	19,1	9,8	0,71	7,2	10,2	1,56	15,3
50	19	0,0	0,5	5,8	14,4	9,9	2,23	22,6	10,2	1,79	17,6	10,4	2,23	21,4
50	16	0,0	0,4	6,9	15,5	10,0	2,45	24,5	10,3	2,13	20,7	10,4	2,45	23,5
50	47	1,7	2,8	6,3	22,4	13,3	3,63	27,4	14,8	2,18	14,7	15,8	3,63	23,0
50	44	1,7	2,1	6,5	27,1	14,8	4,32	29,3	16,4	3,29	20,1	16,8	4,32	25,8
50	31	1,8	1,0	7,2	25,4	18,2	4,48	24,6	19,0	3,68	19,4	19,2	4,48	23,3
50	18	1,7	0,5	15,7	36,0	22,9	6,13	26,8	23,3	5,73	24,6	23,4	6,13	26,2
50	41	2,9	1,7	10,5	46,4	28,2	10,87	38,5	29,5	9,76	33,1	29,9	10,87	36,4
50	31	2,9	1,0	11,8	47,5	29,5	11,77	39,9	30,3	10,90	36,0	30,5	11,77	38,6
50	19	2,9	0,5	14,6	52,1	30,9	11,95	38,7	31,2	11,54	37,0	31,4	11,95	38,0
50	16	2,9	0,4	15,1	54,2	34,9	12,84	36,8	35,1	12,54	35,7	35,3	12,84	36,3
50	43	3,5	2,0	15,4	69,0	41,3	16,20	39,2	42,9	14,99	35,0	43,2	16,20	37,5
50	38	3,7	1,4	16,1	75,8	42,4	18,41	43,5	43,5	17,35	39,9	43,8	18,41	42,0
50	30	3,7	0,9	16,8	80,8	43,1	19,38	44,9	43,9	18,53	42,2	44,1	19,38	44,0
50	21	3,8	0,5	18,8	81,7	44,2	20,49	46,4	44,6	19,99	44,8	44,8	20,49	45,8

^aCálculo a partir de la Distribución de Poisson (Tabla 4)

Sd: Desviación estándar

CV: Coeficiente de variación (%) (100*Sd/media)

Tabla 14.

Fases de latencia de células individuales o micropopulaciones de *Listeria innocua* en TSB a pH ~7,20 supervivientes a diferentes tratamientos acidificantes. Los datos reseñados se han utilizado para ajustar las distribuciones gamma (véase más adelante) porque eran los que más se acercaban a una célula por pocillo.

Nº total de muestras	Nº de muestras con crecimiento	Inactivación lograda (-log ufc/muestra)	Nº promedio de células por muestra ^a	Fases de latencia calculadas con un inóculo de 1 célula/muestra		1 célula			Distribución de Poisson			Distribución de Poisson Truncada		
				Valor mínimo	Valor máximo	Fase de latencia (h)			Fase de latencia (h)			Fase de latencia (h)		
						Media	Sd (h)	CV (%)	Media	Sd (h)	CV (%)	Media	Sd (h)	CV (%)
50	42	0,0	1,8	3,1	6,2	4,3	0,82	18,8	5,9	0,57	9,7	5,9	0,82	13,8
50	27	0,0	0,8	7,2	15,7	9,4	2,29	24,4	10,0	1,99	20,0	10,2	2,29	22,5
50	45	2,1	2,3	7,4	17,1	11,1	2,16	19,4	12,8	1,27	9,9	13,2	2,16	16,4
50	41	2,0	1,7	8,0	17,6	14,0	2,92	20,8	15,3	1,95	12,7	15,6	2,92	18,7
50	35	2,3	1,2	10,5	21,0	15,6	3,50	22,4	16,6	2,61	15,8	16,8	3,50	20,8
50	31	1,8	1,0	14,4	26,5	20,1	4,04	20,1	20,8	3,24	15,5	21,0	4,04	19,2
50	33	3,2	1,1	15,3	35,4	22,7	4,79	21,1	23,5	4,04	17,2	23,7	4,79	20,2
50	24	3,4	0,7	17,4	39,1	25,9	6,72	25,9	26,4	6,15		26,6	6,72	25,3
50	20	3,0	0,5	19,2	52,0	29,1	10,93	37,5	29,6	10,56	35,7	29,7	10,93	36,8
50	47	3,7	2,8	27,5	51,2	35,1	6,19	17,6	37,2	5,10	13,7	37,5	6,19	16,5
50	46	3,8	2,5	28,3	56,1	37,0	7,81	21,1	38,8	6,71	17,3	39,2	7,81	19,9
50	40	3,6	1,7	21,4	58,8	39,0	8,35	21,4	40,9	7,19	17,6	40,6	8,35	20,6
50	24	3,9	0,7	29,7	76,1	46,0	12,93	28,1	46,5	12,45	26,8	46,7	12,93	27,7

^aCálculo a partir de la Distribución de Poisson (Tabla 4)

Sd: Desviación estándar

CV: Coeficiente de variación (%) ($100 \cdot Sd / \text{media}$)

Tabla 15.

Fases de latencia de células individuales o micropopulaciones de *Pseudomonas fluorescens* en TSB a pH ~7,28 supervivientes a diferentes tratamientos acidificantes. Los datos reseñados se han utilizado para ajustar las distribuciones gamma (véase más adelante) porque eran los que más se acercaban a una célula por pocillo.

Nº total de muestras	Nº de muestras con crecimiento	Inactivación lograda (-log ufc/muestra)	Nº promedio de células por muestra ^a	Fases de latencia calculadas con un inóculo de 1 célula/muestra		1 célula			Distribución de Poisson			Distribución de Poisson Truncada		
				Valor mínimo	Valor máximo	Fase de latencia (h)			Fase de latencia (h)			Fase de latencia (h)		
						Media	Sd (h)	CV (%)	Media	Sd (h)	CV (%)	Media	Sd (h)	CV (%)
50	36	0,0	1,3	9,2	25,4	17,4	5,02	28,9	17,8	4,56	25,6	18,0	5,02	27,9
50	29	0,0	0,9	9,9	28,7	19,7	5,93	30,2	20,0	5,51	27,5	20,1	5,93	29,5
50	25	0,0	0,7	12,4	30,1	20,3	6,12	30,2	20,5	5,82	28,4	20,6	6,12	29,7
50	34	3,0	1,1	20,4	42,3	33,1	6,75	20,4	33,5	6,29	18,7	33,7	6,75	20,0
50	28	2,0	0,8	22,2	47,0	37,3	7,08	19,0	37,7	6,65	17,6	37,8	7,08	18,8
50	25	2,1	0,7	22,1	51,8	38,8	8,07	20,8	39,1	7,69	19,7	39,1	8,07	20,6
50	23	2,2	0,6	24,0	52,3	41,7	9,15	21,9	42,0	8,83	21,0	42,1	9,15	21,7
50	38	2,8	1,4	22,1	57,8	42,2	10,75	25,5	42,8	10,19	23,8	42,9	10,75	25,1
50	30	3,1	0,9	27,0	60,7	45,7	11,14	24,4	46,1	10,69	23,2	46,2	11,14	24,1
50	24	3,0	0,7	27,1	64,2	46,9	12,27	26,2	47,2	11,96	25,4	47,3	12,27	26,0
50	19	3,2	0,5	30,2	70,5	50,6	13,18	26,1	50,7	12,96	25,5	50,8	13,18	25,9
50	40	4,9	1,6	30,0	70,8	50,4	12,34	24,5	51,0	11,80	23,1	51,1	12,34	24,1
50	35	4,6	1,2	30,8	74,0	51,4	13,40	26,1	51,9	12,94	24,9	52,0	13,40	25,8
50	30	4,1	0,9	31,8	73,8	54,9	13,48	24,5	55,3	13,03	23,6	55,4	13,48	24,3
50	28	4,2	0,8	33,9	80,5	57,12	14,02	24,5	57,45	13,62	23,7	57,54	14,02	24,4

^aCálculo a partir de la Distribución de Poisson (Tabla 4)

Sd: Desviación estándar

CV: Coeficiente de variación (%) (100*Sd/media)

Tabla 16.

Fases de latencia de células individuales o micropopulaciones de *Salmonella* Enteritidis en TSB a pH ~7,24 supervivientes a diferentes tratamientos acidificantes. Los datos reseñados se han utilizado para ajustar las distribuciones gamma (véase más adelante) porque eran los que más se acercaban a una célula por pocillo.

Nº total de muestras	Nº de muestras con crecimiento	Inactivación lograda (-log ufc/muestra)	Nº promedio de células por muestra ^a	Fases de latencia calculadas con un inóculo de 1 célula/muestra		1 célula			Distribución de Poisson			Distribución de Poisson Truncada		
				Valor mínimo	Valor máximo	Fase de latencia (h)			Fase de latencia (h)			Fase de latencia (h)		
						Media	Sd (h)	CV (%)	Media	Sd (h)	CV (%)	Media	Sd (h)	CV (%)
50	46	0,0	2,5	0,7	7,0	3,8	1,32	34,5	5,4	0,54	10,0	5,7	1,32	23,0
50	34	0,0	1,1	2,5	11,3	5,2	2,22	42,7	6,0	1,68	28,1	6,2	2,22	35,9
50	32	0,0	1,0	1,4	11,2	5,9	2,71	45,7	6,7	2,06	31,0	6,8	2,71	39,8
50	20	0,0	0,5	1,4	14,1	6,9	4,44	64,8	7,2	4,07	56,3	7,3	4,44	60,7
50	42	2,9	1,8	0,1	19,3	7,7	6,27	81,8	8,9	5,35	60,4	9,1	6,27	68,6
50	36	2,2	1,3	0,6	19,8	10,1	6,65	66,0	10,9	5,87	54,1	11,1	6,65	59,7
50	28	3,2	0,8	0,7	23,1	13,4	7,44	55,5	14,0	6,73	48,2	14,1	7,44	52,7
50	22	2,9	0,6	0,6	25,3	14,7	8,44	57,4	15,1	7,89	52,2	15,2	8,44	55,4
50	45	3,3	2,3	3,5	28,9	16,6	8,01	48,2	18,1	7,01	38,8	18,4	8,01	43,5
50	42	3,5	1,8	4,8	33,3	17,6	8,98	51,0	18,8	8,02	42,6	19,1	8,98	47,1
50	31	2,1	1,0	5,1	34,8	18,7	9,35	50,1	19,3	8,63	44,6	19,5	9,35	48,0
50	21	3,1	0,5	4,0	34,9	20,4	10,05	49,4	20,7	9,57	46,2	20,9	10,05	48,2
50	39	3,7	1,5	5,7	37,0	20,2	9,51	47,1	21,2	8,63	40,7	21,4	9,51	44,4
50	34	4,1	1,1	9,3	39,2	23,5	10,27	43,6	24,3	9,52	39,2	24,5	10,27	41,9
50	30	4,6	0,9	9,6	41,1	24,8	11,10	44,8	25,40	10,39	40,9	25,57	11,10	43,4
50	26	4,4	0,7	9,7	45,0	25,2	12,03	47,7	25,7	11,51	44,9	25,8	12,03	46,5

^aCálculo a partir de la Distribución de Poisson (Tabla 4)

Sd: Desviación estándar

CV: Coeficiente de variación (%) (100*Sd/media)

Tabla 17.

Fases de latencia de células individuales o micropopulaciones de *Listeria innocua* en TSB a pH ~5,20 supervivientes a diferentes tratamientos acidificantes. Los datos reseñados se han utilizado para ajustar las distribuciones gamma (véase más adelante) porque eran los que más se acercaban a una célula por pocillo.

Nº total de muestras	Nº de muestras con crecimiento	Inactivación lograda (-log ufc/muestra)	Nº promedio de células por muestra ^a	Fases de latencia calculadas con un inóculo de 1 célula/muestra		1 célula			Distribución de Poisson			Distribución de Poisson Truncada		
				Valor mínimo	Valor máximo	Fase latencia (h)			Fase latencia (h)			Fase latencia (h)		
						Media	Sd (h)	CV (%)	Media	Sd (h)	CV (%)	Media	Sd (h)	CV (%)
50	40	0,0	1,6	0,9	14,7	4,6	4,40	95,1	8,9	2,40	27,1	9,9	4,40	44,5
50	30	0,0	0,9	1,1	16,9	9,3	4,52	48,7	11,7	3,23	27,7	12,5	4,52	36,3
50	20	0,0	0,5	2,8	22,4	12,9	5,92	45,9	14,4	4,30	29,9	14,7	5,92	40,2
50	39	2,1	1,5	0,2	22,4	10,4	6,37	61,0	14,3	3,15	22,0	15,4	6,37	41,3
50	29	2,0	0,9	2,6	29,6	16,8	8,64	51,4	19,2	6,00	31,3	19,8	8,64	43,6
50	17	3,2	0,4	2,5	35,9	20,4	9,19	45,1	21,4	8,24	38,6	24,0	8,68	36,2
50	41	3,2	1,7	2,8	34,9	18,3	10,64	58,1	22,8	7,12	31,3	23,9	10,64	44,6
50	34	2,9	1,1	2,7	39,9	23,6	12,17	51,7	26,5	9,16	34,5	27,4	12,17	44,4
50	23	3,7	0,6	9,2	47,8	31,0	13,03	42,0	32,6	11,16	34,3	33,2	13,03	39,2
50	35	3,1	1,2	21,3	72,5	45,6	14,67	32,1	49,6	12,35	24,9	49,7	14,24	28,7
50	31	4,1	1,0	31,0	85,9	50,8	16,25	32,0	53,6	15,15	28,3	54,2	16,25	30,0
50	27	4,6	0,8	28,6	97,8	56,3	18,62	33,1	58,4	18,55	31,8	58,6	18,11	30,9
50	18	4,1	0,5	31,3	109,4	73,5	23,70	32,2	74,9	23,24	31,0	75,1	21,75	29,0

^a Cálculo a partir de la Distribución de Poisson (Tabla 4)

Sd: Desviación estándar

CV: Coeficiente de variación (%) (100*Sd/media)

Tabla 18.

Fases de latencia de células individuales o micropopulaciones de *Pseudomonas fluorescens* en TSB a pH ~5,12 supervivientes a diferentes tratamientos acidificantes. Los datos reseñados se han utilizado para ajustar las distribuciones gamma (véase más adelante) porque eran los que más se acercaban a una célula por pocillo.

Nº total de muestras	Nº de muestras con crecimiento	Inactivación lograda (-log ufc/muestra)	Nº promedio de células por muestra ^a	Fases de latencia calculadas con un inóculo de 1 célula/muestra		1 célula			Distribución de Poisson			Distribución de Poisson Truncada		
				Valor mínimo	Valor máximo	Fase latencia (h)			Fase latencia (h)			Fase latencia (h)		
						Media	Sd (h)	CV (%)	Media	Sd (h)	CV (%)	Media	Sd (h)	CV (%)
50	43	0,0	2,0	19,6	30,5	24,4	2,28	9,4	25,8	1,39	5,4	26,1	2,28	8,7
50	40	0,0	1,6	20,8	33,3	25,9	3,20	12,4	27,1	2,32	8,6	27,4	3,20	11,7
50	32	0,0	1,0	21,0	34,0	28,2	4,05	14,3	28,9	3,26	11,3	29,2	4,05	13,9
50	24	0,0	0,7	20,8	39,2	30,3	5,14	17,0	30,8	4,57	14,8	30,9	5,14	16,6
50	44	1,6	2,1	17,5	37,5	28,6	6,25	21,9	30,0	5,17	17,2	30,3	6,25	20,6
50	40	2,4	1,6	17,0	40,4	30,4	7,14	23,5	31,6	6,16	19,5	31,8	7,14	22,4
50	28	2,7	0,8	21,3	44,1	33,8	7,36	21,8	34,4	6,59	19,1	34,6	7,36	21,3
50	24	2,2	0,7	19,6	48,4	34,8	8,87	25,5	35,3	8,27	23,5	35,5	8,87	25,0
50	46	3,0	2,5	19,3	52,2	34,8	9,98	28,6	36,6	8,89	24,3	36,9	9,98	27,0
50	42	3,3	1,8	20,6	54,8	36,2	10,81	29,9	37,5	9,79	26,1	37,8	10,81	28,6
50	34	3,5	1,1	23,1	58,8	41,1	11,04	26,9	41,9	10,22	24,4	42,2	11,04	26,2
50	27	3,6	0,8	24,3	71,5	43,5	14,71	33,8	44,0	14,13	32,1	44,2	14,71	33,3
50	42	4,3	1,8	16,0	71,1	42,7	15,48	36,2	44,0	14,43	32,8	44,3	15,48	34,9
50	37	4,7	1,4	19,0	74,4	43,5	17,24	39,7	44,4	16,41	37,0	44,7	17,24	38,6
50	33	4,2	1,1	19,6	75,3	47,0	17,34	36,9	47,8	16,53	34,6	48,0	17,34	36,1
50	23	4,9	0,6	21,0	79,8	51,5	18,23	35,4	51,9	17,66	34,0	52,1	18,23	35,0

^a Cálculo a partir de la Distribución de Poisson (Tabla 4)

Sd: Desviación estándar

CV: Coeficiente de variación (%) ($100 \cdot Sd / media$)

Tabla 19.

Fases de latencia de células individuales o micropopulaciones de *Salmonella* Enteritidis en TSB a pH ~5,24 supervivientes a diferentes tratamientos acidificantes. Los datos reseñados se han utilizado para ajustar las distribuciones gamma (véase más adelante) porque eran los que más se acercaban a una célula por pocillo.

Nº total de muestras	Nº de muestras con crecimiento	Inactivación lograda (-log ufc/muestra)	Nº promedio de células por muestra ^a	Fases de latencia calculadas con un inóculo de 1 célula/muestra		1 célula			Distribución de Poisson			Distribución de Poisson Truncada		
				Valor mínimo	Valor máximo	Fase latencia (h)			Fase latencia (h)			Fase latencia (h)		
						Media	Sd (h)	CV (%)	Media	Sd (h)	CV (%)	Media	Sd (h)	CV (%)
50	44	0,0	2,1	0,0	20,0	7,1	5,00	70,7	8,9	3,74	42,0	9,4	5,00	53,4
50	35	0,0	1,2	0,1	20,8	8,7	5,51	63,1	9,8	4,56	46,3	10,1	5,51	54,3
50	27	0,0	0,8	1,5	20,9	10,7	6,49	60,9	11,3	5,70	50,3	11,6	6,49	55,8
50	20	0,0	0,5	2,6	26,8	12,3	7,48	60,9	12,8	6,90	54,0	12,9	7,48	57,9
50	45	2,1	2,3	2,3	25,8	9,8	5,74	58,6	13,2	5,73	43,4	13,6	7,07	51,8
50	41	2,6	1,7	2,1	28,4	11,9	8,61	72,3	13,5	7,42	55,2	13,8	8,61	62,2
50	35	2,8	1,2	3,1	29,8	14,2	9,06	63,7	15,3	8,05	52,5	15,6	9,06	57,9
50	29	2,9	0,9	4,3	31,7	16,6	9,21	55,4	17,5	8,31	47,6	17,7	9,21	52,0
50	44	2,9	2,1	3,4	32,8	15,8	9,40	59,5	17,8	8,07	45,4	18,1	9,40	51,9
50	40	3,1	1,6	3,1	38,9	17,3	10,85	62,8	18,7	9,62	51,3	19,1	10,85	56,8
50	39	4,0	1,5	5,1	40,2	18,9	10,98	58,1	20,2	9,82	48,5	20,6	10,98	53,2
50	29	3,2	0,9	4,9	42,8	25,7	12,78	49,8	25,9	11,78	45,5	26,1	12,78	49,0
50	43	4,3	2,0	5,9	46,5	26,2	12,50	47,8	28,0	11,12	39,7	28,4	12,50	44,1
50	36	4,0	1,3	8,7	48,2	30,6	13,87	45,3	31,8	12,69	40,0	32,1	13,87	43,2
50	25	4,1	0,7	9,1	55,5	32,6	14,28	43,7	33,3	13,46	40,4	33,5	14,28	42,6
50	22	5,2	0,6	11,9	57,9	34,0	15,42	45,4	34,5	14,74	42,7	34,7	15,42	44,4

^a Cálculo a partir de la Distribución de Poisson (Tabla 4)

Sd: Desviación estándar

CV: Coeficiente de variación (%) (100*Sd/media)

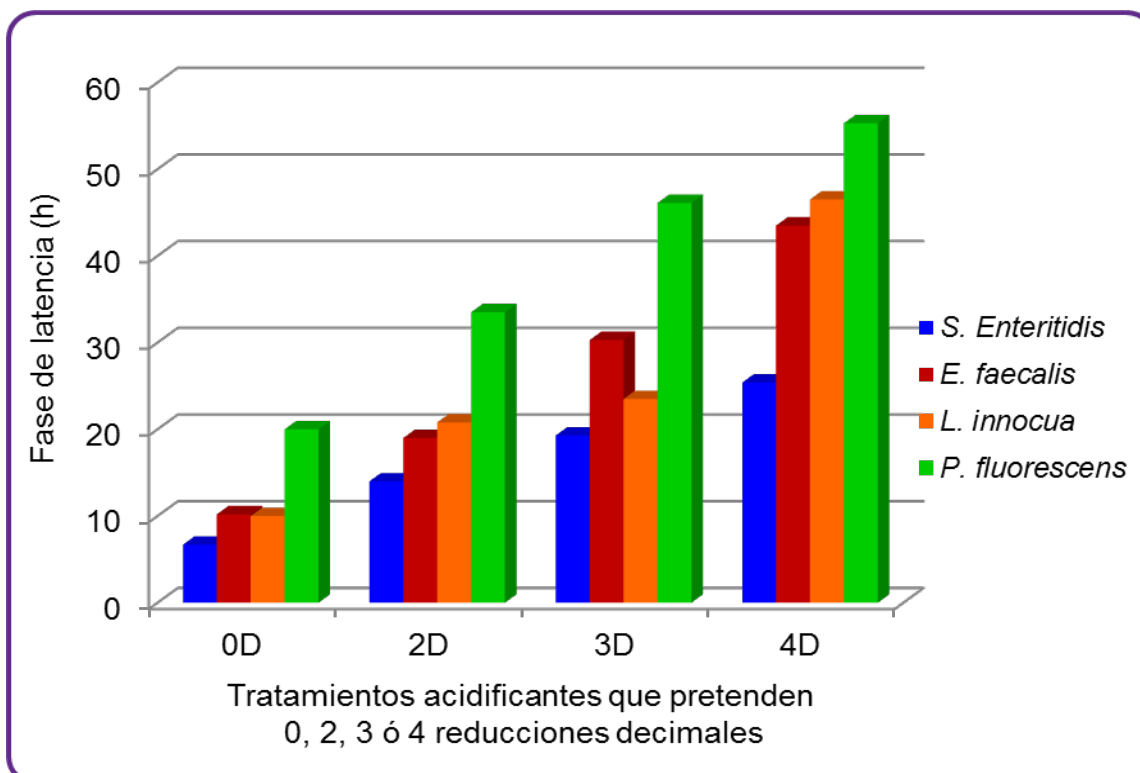


Figura 45. Fases de latencia medias de células individualizadas y micropoblaciones de los microorganismos indicados en TSB a pH neutro y 20°C, calculadas siguiendo la alternativa de Poisson. Los datos son medias de los mostrados en las Tablas 13, 14, 15 y 16.

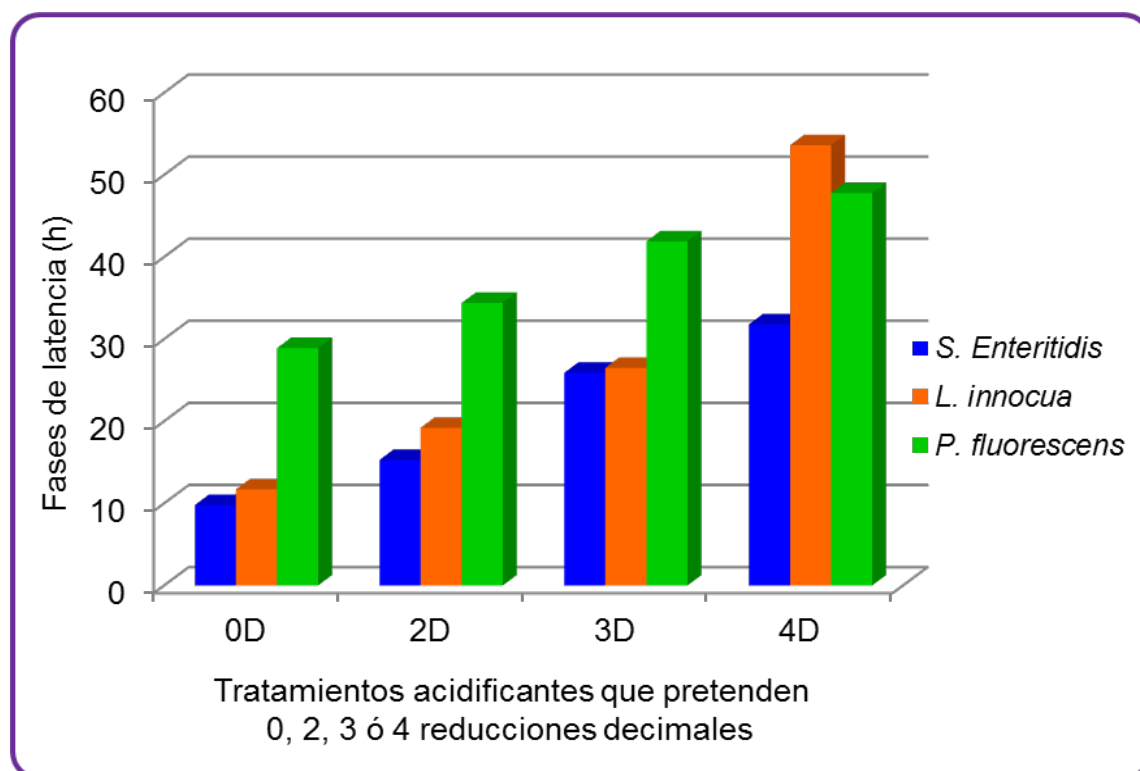


Figura 46. Fases de latencia medias de células individualizadas y micropoblaciones de los microorganismos indicados en TSB a pH ácido y 20°C, calculadas siguiendo la alternativa de Poisson. Los datos son medias de los mostrados en las Tablas 17, 18 y 19.

En las Figuras 45 y 46 se muestran las fases de latencia medias calculadas con la distribución de Poisson para que puedan compararse más fácilmente y observar lo que se discutió en el párrafo anterior. Las fases de latencia de las Tablas 13, 14, 15 y 16 y Figura 45 a pH neutro varían en relación a la resistencia de los microorganismos a la acidez, pero esta resistencia va asociada al efecto combinado de cuatro factores como son la intensidad del tratamiento, tamaño del inóculo, temperatura y pH de incubación, así por ejemplo la media de la fase latencia en *E. faecalis* está entre 6,1 y 44,6 h y una *Sd* de 0,43 y 19,99 h. En estas mismas condiciones, las fases de latencia de *L. innocua* varían desde 5,9 h hasta 46,5 h y una *Sd* de 0,57 a 12,45 h. En contraste, *S. Enteritidis* presentó fases de latencia entre 5,4 y 25,7 h y *Sd* de 0,54 a 11,51 h, datos que parecen indicar que esta bacteria es más resistente a la acidez que las otras o se adapta más deprisa a la acidez, mientras *P. fluorescens* parece la más sensible, con fases de latencia más prolongadas, de 17,8 y 57,45 h y una variabilidad o *Sd* de 4,56 a 13,62 h. Estos resultados están de acuerdo con estudios realizados por Koutsoumanis y Sofos (2004), quienes observaron que el género *Salmonella* seguida de *Listeria* presentaban una mayor resistencia a tratamientos ácidos.

Por otro lado, dos Santos (2007) analizó la fase de latencia de *L. monocytogenes* en TSB con sal (4,5%) a 22°C y pH 7,4 y la determinó en 15 h. Sin embargo, Vialette y col. (2003), trabajando con 8 cepas de *L. monocytogenes* creciéndolas en 4 % de NaCl a pH 7 a 20°C, informaron de una fase de latencia de tan solo 1,80 horas. A este respecto, puede sugerirse que la variabilidad de las fases de latencia viene determinada por la heterogeneidad entre las células individuales dentro de una población clonal, debido a que hay muchos factores que influyen en el comportamiento individual durante la fase de latencia y no es fácil precisar la heterogeneidad fisiológica de los microorganismos (Guillier y col., 2005) ni qué es necesario para que una bacteria comience su multiplicación. Se han presentado diferentes hipótesis al respecto, entre las que destaca la formulada por Hornbaek y col. (2002), quienes revelaron que la capacidad de multiplicarse de una célula implica una gran cantidad de trabajo a realizar para recuperar su estado fisiológico, que se correlaciona con el pH intracelular. Este estudio además reveló que la subpoblación de células expuestas a menor pH intracelular presentaba fases de latencia significativamente más largas que las de las poblaciones de células que tienen un pH intracelular más alto. Sin embargo, el crecimiento requiere de la restauración de los procesos metabólicos, que varían en función de la naturaleza del

ácido utilizado, estableciéndose sistemas de reparación que implican síntesis de ATP, ARN y ADN (Booth, 2002). Considerando todos estos factores puede entenderse que la fase de latencia sea peculiar para cada microorganismo y condición por la que haya pasado y en la que se encuentre, lo que dificulta considerablemente su predicción y la comparación entre los hallazgos de diferentes autores a este respecto.

Antes de continuar con la discusión acerca de la fase de latencia, centrémonos en la variabilidad observada en el presente trabajo. En las Tablas 13 a 19 se detalla la desviación estándar de las distribuciones de fases de latencia observadas y las Figuras 47 y 48 son histogramas que recogen los promedios de las desviaciones estándar de todas las experiencias llevadas a cabo y que se han plasmado en las Tablas antes dichas. La observación de las Figuras hace palpable que la desviación estándar va incrementándose conforme se incrementa la intensidad de la acidificación, que causa la inactivación de las células.

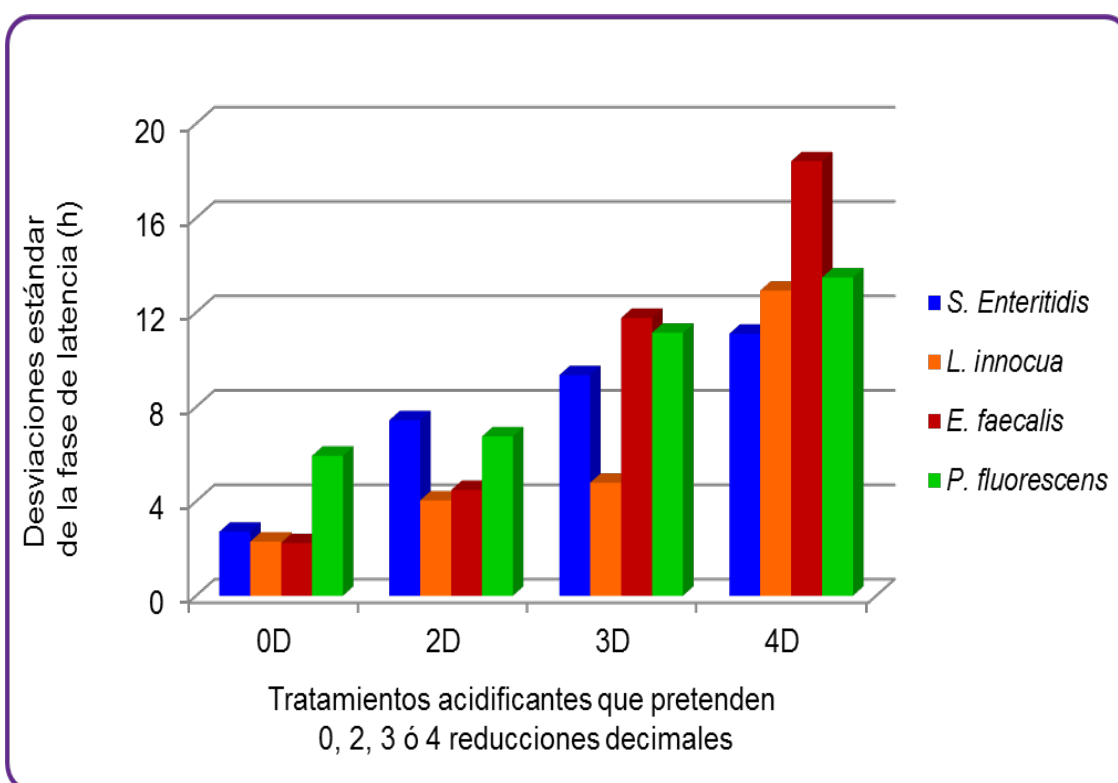


Figura 47. Desviación estándar de las fases de latencia de células individualizadas de los microorganismos en TSB a pH neutro y 20°C, calculadas siguiendo la alternativa de 1 célula por muestra o la de Poisson Truncada. Los datos son medias de los mostrados en las Tablas 13, 14, 15 y 16.

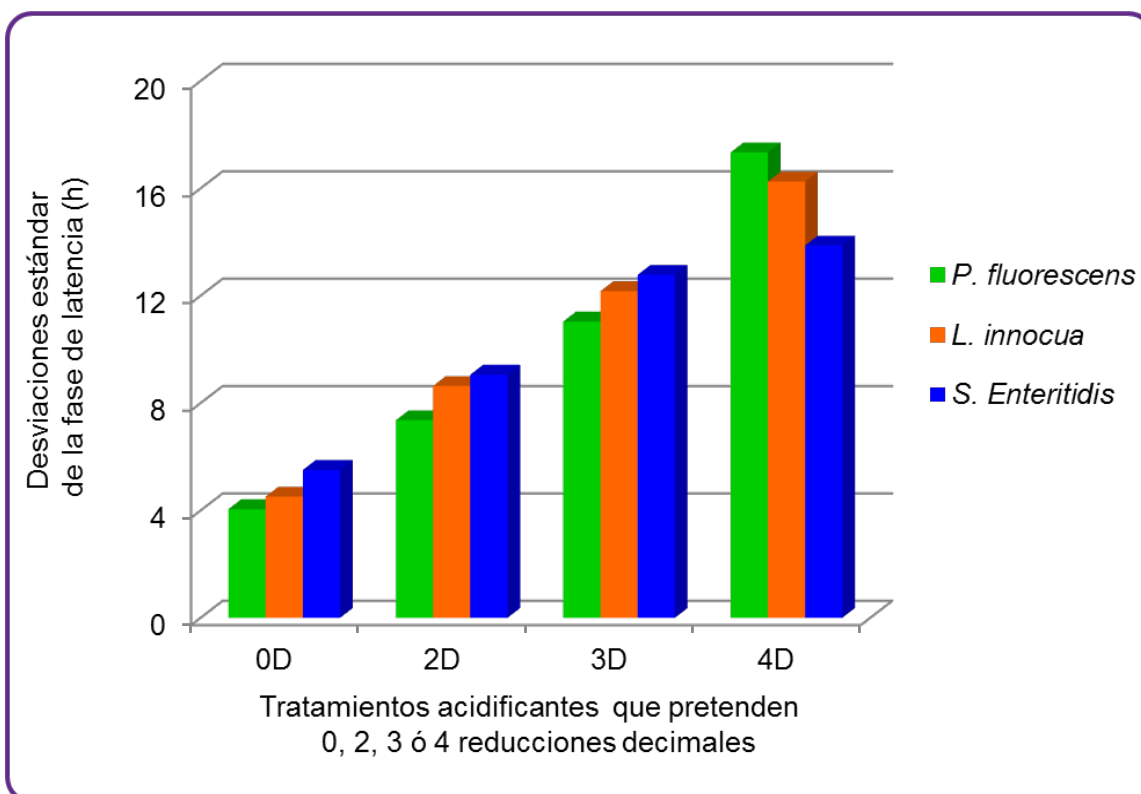


Figura 48. Desviaciones estándar de las fases de latencia de células individualizadas de los microorganismos indicados en TSB a pH ácido y 20°C, calculadas siguiendo la alternativa de 1 célula por muestra o la de Poisson Truncada. Los datos son medias de los mostrados en las Tablas 17, 18 y 19.

Las Figuras 49 y 50 se han construido con el fin de dilucidar si realmente la intensificación del tratamiento acidificante provocaba un aumento de la variabilidad de las fases de latencia de las células supervivientes a dichos tratamientos. Estas gráficas se han construido de igual manera que las anteriores, recopilando los valores medios de los coeficientes de variación mostrados en las Tablas 13, 14, 15 y 16 para la Figura 49 y 17, 18 y 19 para la 50. La observación de estas figuras puede dejar algunas dudas, ya que en la 49, aparece una tendencia alcista del coeficiente de variación de la fase de latencia de *E. faecalis* y lo mismo ocurre con el de *P. fluorescens* en la Figura 50, las demás no corroboran estas observaciones, por lo que la conclusión debe ser que el aumento de la desviación estándar tan claro (Figuras 47 y 48) es un reflejo del aumento progresivo de la fase de latencia al ir intensificándose el tratamiento acidificante y no se debe a un incremento de la variabilidad del comportamiento microbiano como ocurre en la variabilidad de la inactivación mediante acidificación (véase la Tabla 6) u otras operaciones conservantes, como el calor y la irradiación con electrones acelerados (Aguirre, 2012). En suma, aunque la desviación estándar de ambas, la inactivación y la

fase de latencia de los supervivientes, aumenta proporcionalmente con el grado de inactivación, tal incremento debe tener diferente origen. En el caso de la inactivación se debe a la variabilidad de la inactivación *per se*, dado que el coeficiente de variación, cuyo valor es independiente de los valores de las muestras, aumenta constantemente al incrementarse el grado de inactivación, mientras que las mayores desviaciones estándar de las fases de latencia pueden deberse simplemente a que las fases de latencia son más prolongadas en las muestras que han recibido tratamiento acidificante más intensos.

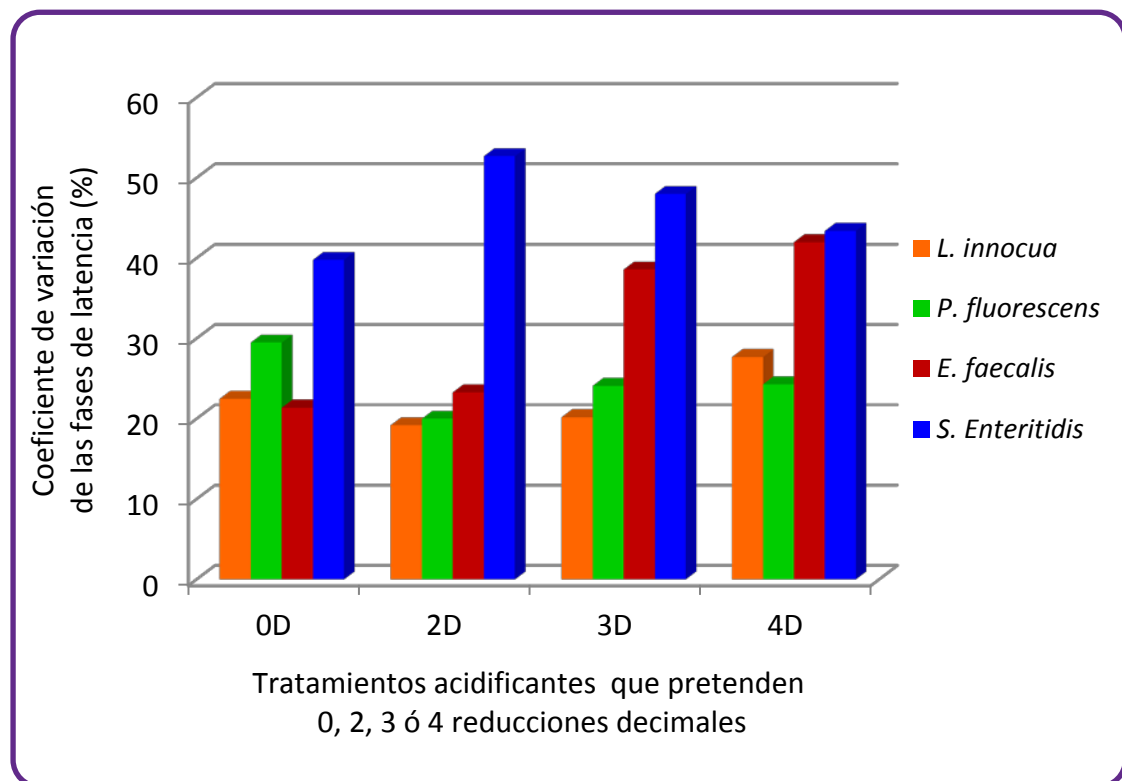


Figura 49. Coeficientes de variación medios de las fases de latencia de células individualizadas de los microorganismos indicados en TSB a pH neutro y 20°C, calculadas siguiendo la alternativa de 1 célula por muestra o la de Poisson Truncada. Los datos son medias de los mostrados en las Tablas 13, 14, 15 y 16.

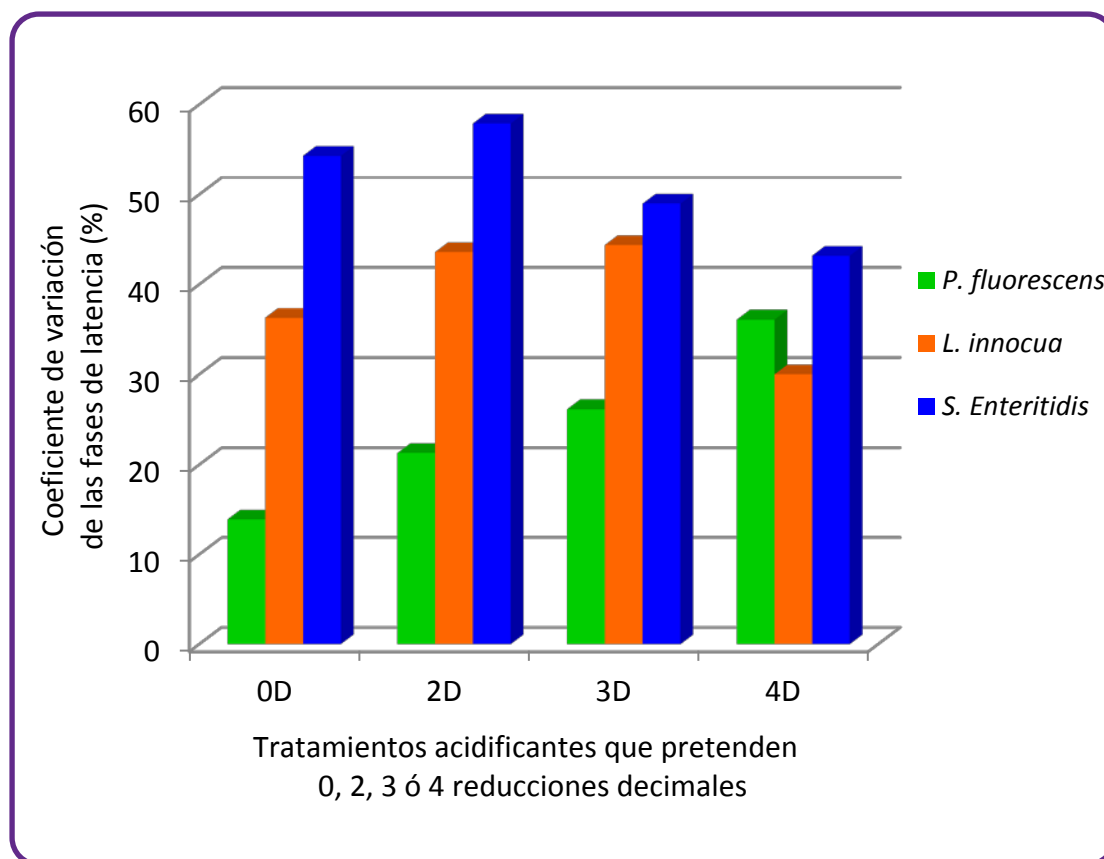


Figura 50. Coeficientes de variación medios de las fases de latencia de células individualizadas de los microorganismos indicados en TSB a pH ácido y 20°C, calculadas siguiendo la alternativa de 1 célula por muestra o la de Poisson Truncada. Los datos son medias de los mostrados en las Tablas 17, 18 y 19.

Aunque no son muchos los autores que han trabajado con variabilidad de la fase de latencia, los coeficientes de variación calculados aquí y comentados más arriba pueden calificarse como similares a los publicados por otros autores (Koutsoumanis y Sofos, 2003; Métris y col., 2008; Aguirre y col., 2012; Aguirre y col., 2013a). Todos ellos dan coeficientes entre un 20 y un 40% para células que han sufrido diferentes grados de estrés, similares a los que sobrevivieron las células en el presente trabajo. No obstante, pueden apreciarse ciertas diferencias entre los datos ofrecidos por diferentes autores. Aguirre y col. (2013b) analizó la variabilidad de la fase de latencia de las mismas cepas estudiadas aquí tras tratamientos térmicos y de irradiación con electrones acelerados con unas eficacias microbicidas idénticas a las aplicadas en esta Tesis, observando fases de latencia proporcionalmente más largas y menos variables que con acidificación; por citar algún ejemplo, tras tratamientos térmicos que reducían la población entre 0 y 4 ciclos logarítmicos, las fases de latencia medias de *E. faecalis* a 18°C fluctuaron de 5,8 a 63,5 h con desviaciones estándar desde 2,24 a 18,99 h. En

cambio en esta Tesis, para el mismo microorganismo y eficacias microbicidas, las medias de las fases de latencia a 20°C en el mismo sustrato, TSB, resultaron ser entre 3,9 y 44,8 h y las *Sd* entre 0,43 y 20,49 h. Por otro lado, *S. Enteritidis*, con los mismos tratamientos térmicos e incubada a 16°C en TSB presentó fases de latencia más largas y con mayores *Sds* que las aquí descritas, aunque, debe considerarse que estas últimas fueron a 20°C.

Que una misma población, surgida de una única célula con, teóricamente, la misma genética, tenga respuestas variables ante un tratamiento y condiciones idénticas implica una variabilidad entre las células. Guillier y col. (2005) utilizó este mismo razonamiento para explicar la variabilidad de la fase de latencia de poblaciones microbianas tratadas en medio ácido. Esta variabilidad intrínseca ya había sido apuntada por otros autores anteriormente observando diferencias en el pH intracelular (Rechinger y Siegmund, 2002), en la morfología celular (Rowan y Anderson, 1998) y/o en la síntesis de ácidos grasos de ciclopropano (como respuesta al shock ácido) (Dunkley y col., 1991). Dentro de esta misma línea, Stephens y col. (1997) indicaron que el estado fisiológico de las células en las distintas fases de crecimiento tendría un reflejo en su resistencia a condiciones adversas y en su adaptabilidad al acceder a un determinado ambiente. Algunos de estos autores trabajaron con *Salmonella* spp. y apreciaron que las células en fase exponencial de crecimiento (de tamaño mayor) son más sensibles que en la estacionaria (las menores) y las supervivientes grandes a un proceso térmico quedarían más dañadas y necesitarían de más tiempo para repararse y quedar en disposición de multiplicarse. Todos estos factores permiten entrever que es más probable una mayor variabilidad en las condiciones más adversas porque habrá una parte de los supervivientes que necesitarán mucho tiempo para comenzar la multiplicación, un hecho que raramente se encontrará en células más resistentes que hayan sido tratadas con un proceso conservante poco intenso. Por otra parte, la literatura advierte que unas de las posibles causas de la variabilidad durante la inactivación es el tipo y concentración del acidulante (Koutsoumanis y col., 2003; dos Santos, 2007; Álvarez, 2009), sumada a la incertidumbre propia del ajuste del pH y sus consecuencias; recuérdese que este parámetro es logarítmico y una diferencia de una décima de más o de menos en el valor final del pH determina variaciones de algo más del 25% en la concentración de hidrogeniones, exactamente una décima más de pH implica un incremento del 25,89%, cantidades que al ir acumulándose hacen que el incremento de

1 unidad de pH implique un incremento de 10 veces la concentración de H^+ libres. A esto se le debe unir el efecto que tiene el pH en el grado de disociación del ácido acético y su consecuencia directa en la concentración de la forma no disociada del ácido.

En relación a la influencia que ejercen las condiciones de pre-adaptación celular, es decir, que las células hayan estado en un ambiente ácido suave antes del tratamiento acidificante e inactivante, la revisión bibliográfica confirma (Koutsoumanis y col., 2003; Guillier y col., 2005; Métris y col., 2006; dos Santos, 2007; Álvarez, 2009), que la tolerancia ácida está relacionada con la exposición a ácidos orgánicos que inducen respuestas de adaptación, haciéndolas más tolerantes a la acidez. de Jonge y col. (2003) apreciaron que *S. typhimurium* tras una estancia de 1 hora a pH 4,4, mostraba una mayor resistencia a un tratamiento a pH 3,0, es decir determinaron que la adaptación a un nuevo medio de crecimiento está condicionada por la “historia o antecedentes” de las células, es decir las condiciones de precultivo o de preincubación (Dufrenne y col., 1997). La adaptación a la acidez de *S. typhimurium* depende de la capacidad reguladora de su citoplasma a una exposición breve a medios ligeramente ácidos (prechoque), seguida de la exposición de las células adaptadas al pH de tratamiento (choque ácido) desencadenando una compleja respuesta de ácido tolerancia que potencia la supervivencia del microorganismos en medios sumamente ácidos (pH 3,0 a 4,0) (D'Aoust, 2000). En este mismo orden de cosas, Álvarez (2009) apunta que la adaptación a la acidez es un proceso complicado, en la que se producen muchos cambios en las bases moleculares de la célula como efecto del complejo mecanismo de inactivación.

4.3.5.1 Comparación de los valores obtenidos con las tres alternativas para la estimación del inóculo: 1 Célula, Distribución de Poisson y Distribución Truncada de Poisson

En las Tablas 13 a 19 se muestran tres bloques de valores, correspondientes a tres alternativas de estimación del inóculo inicial, ya que es materialmente imposible conocer realmente con qué inóculo se está trabajando porque, obviamente, si se recuentan los microorganismos existentes en un pocillo, esa muestra se ha perdido. Recuérdese que las tres alternativas eran:

- En todos los pocillos donde se detectaba crecimiento, este procedía de una sola célula (bloque 1 Célula).
- El número de células por pocillo seguía la distribución de Poisson (Tablas 4 y 12) y se le asignaba a la muestra de más corto tiempo de detección, el inóculo mayor, al segundo más rápido, el siguiente inóculo más grande y así sucesivamente. Bloque “Poisson”.
- A todas las muestras con crecimiento se le asignaba el mismo inóculo, el número medio de células por pocillo con crecimiento. Para calcularlo, una vez conocido el porcentaje de muestras con crecimiento, se recurre a la Tabla 4 y se obtiene el número medio de células por muestra considerando las que presentan y las que no presentan crecimiento). A continuación, se multiplica esa cifra por el número total de muestras analizadas y se divide por el número de muestras con crecimiento para obtener, finalmente, el número medio de células por muestra con crecimiento. Véase un ejemplo. Sea una microplaca de Bioscreen en el que han crecido la mitad de las muestras, en la Tabla 4 dice que cuando la probabilidad de que no se produzca crecimiento es de 0,5, el número medio de células por muestra es de 0,693; como son 100 muestras, Poisson predice que existirán 69,3 células en total, pero como ha habido crecimiento en 50 pocillos, se estima que cada uno contendrá 1,386 células. Esta es la forma de calcular el inóculo para la estimación de los parámetros mostrados en la columna “Poisson Truncado” de las Tablas 13 - 19.

Las pequeñas diferencias en la estimación del inóculo tienen repercusiones en los datos obtenidos:

- Al comparar las fases de latencia medias se aprecia que siempre es menor cuando se considera que hay solo una célula por pocillo. Esto no podría ser de otra manera ya que el logaritmo natural de uno es cero, por lo que cuando el inóculo es mayor de 1, se resta al tiempo de detección (Ecuación 25) un número mayor y la fase de latencia será mayor.
- La comparación de las desviaciones estándar permite observar que cuando se asignan diferentes inóculos a cada muestra (Bloque Distribución de Poisson), la

variabilidad es siempre menor porque al asignar a las muestras con los tiempos de detección más cortos, los inóculos más elevados, al ser mayor de 1, el logaritmo es mayor de cero, con lo que la fase de latencia aumenta y se acerca a la media. En suma, la variabilidad disminuye. La Tabla 20 recoge las Ecuaciones, obtenidas por regresión lineal, que relacionan la variabilidad en términos de *Sd* de las fases de latencia en función del tratamiento acidificante al que las células han sobrevivido.

Tabla 20.

Ecuaciones de regresión lineal que relacionan la desviación estándar (*Sd*) (*y*) de la fase de latencia de células individuales, calculadas mediante la distribución de Poisson o la distribución de Poisson Truncada (véanse las Tablas 13-19), con el número de ciclos logarítmicos de inactivación al que han sobrevivido esas células (*x*). Se muestran los correspondientes coeficientes de determinación (R^2).

Organismos	Condiciones de crecimiento	Datos de la columna distribución de Poisson de las Tablas 13-19		Datos de la columna distribución de Poisson Truncada de las Tablas 13-19	
		Ecuación	R^2	Ecuación	R^2
<i>E. faecalis</i>	TSB, 20°C pH ~7,37	$y = 4,3532x - 0,4158$	0,8358	$y = 4,4671x - 0,0827$	0,8500
<i>L. innocua</i>	TSB, 20°C pH ~7,20	$y = 2,1373x + 0,6757$	0,5981	$y = 2,1965x + 1,1239$	0,6385
	TSB, 20°C pH ~5,20	$y = 2,8111x + 2,0598$	0,901	$y = 2,8597x + 3,962$	0,977
<i>P. fluorescens</i>	TSB, 20°C pH ~7,28	$y = 1,5893x + 4,9075$	0,5774	$y = 1,5978x + 5,3304$	0,5820
	TSB, 20°C pH ~5,12	$y = 2,7446x + 2,0153$	0,7887	$y = 2,7509x + 2,7946$	0,7882
<i>S. Enteritidis</i>	TSB, 20°C pH ~7,24	$y = 1,6459x + 2,8799$	0,7946	$y = 1,6598x + 3,5454$	0,7937
	TSB, 20°C pH ~5,24	$y = 1,9939x + 4,3005$	0,8808	$y = 2,0329x + 5,2106$	0,8738

Si se aplican las ecuaciones mostradas en la Tabla 20, puede predecirse la desviación estándar *y*, por tanto, la variabilidad de las fases de latencia de las células sobrevivientes a tratamientos acidificantes. No obstante, hay que considerar que dependiendo de la forma de calcular las fases de latencia (Distribución de Poisson o Poisson Truncado), las predicciones no serán las mismas, siendo siempre las primeras iguales o mayores que las segundas como puede comprobarse en la Tabla 21 en el que

se expone un ejemplo que se aplican las Ecuaciones de la Tabla 20 con una inactivación de 4 ciclos logarítmicos.

Tabla 21.

Desviaciones estándar de las fases de latencia de células individualizadas predichas por las ecuaciones de la Tabla 20, suponiendo que las células han sobrevivido a un tratamiento que ha inactivado 4 ciclos logarítmicos de microorganismos.

Microorganismo y pH del TSB	Ecuaciones calculadas a partir de fases de latencia estimadas mediante la Distribución de Poisson	Ecuaciones calculadas a partir de fases de latencia estimadas mediante la Distribución de Poisson Truncada
<i>E. faecalis</i> , pH 7,37	17,0	17,8
<i>L. innocua</i> , pH 7,20	9,2	9,9
<i>L. innocua</i> , pH 5,20	13,3	15,4
<i>P. fluorescens</i> , pH 7,28	11,3	11,7
<i>P. fluorescens</i> , pH 5,12	13,0	13,8
<i>S. Enteritidis</i> , pH 7,24	9,5	10,2
<i>S. Enteritidis</i> , pH 5,24	12,3	13,3

- Es obvio que las desviaciones estándar de los datos de los bloques “1 Célula” y “Distribución de Poisson Truncado” de las Tablas 13 a 19 son las mismas porque el inóculo, en ambos casos, es constante aunque sea diferente para cada bloque, por lo que en las Tablas 20 y 21 no se muestran las Ecuaciones que le corresponderían a los datos de 1C, porque serían idénticas a las de Poisson Truncado.
- Respecto a los coeficientes de variación, los menores corresponden al bloque “Distribución de Poisson” como era de esperar dado que las Sd eran menores, después los de la “Distribución Truncada de Poisson” y finalmente los de 1 célula porque las medias de las fases de latencia son algo superiores en el bloque Truncado porque el inóculo es siempre mayor de uno.

¿Qué datos deben ser más fiables? Desde el punto de vista de la autora de esta Tesis, los menos fiables serán los de “1 célula” porque, obviamente, es algunos pocillos con crecimiento habrá una sola célula, pero los datos de los pocillos donde haya más de

una, siempre serán algo erróneos y, obviamente, cuantos más pocillos con crecimiento se tengan en un experimento, mayor será el error que se cometa porque más muestras contendrán dos, tres, etc. células viables (véase la Tabla 12). Más difícil es decantarse por cualquiera de las otras dos alternativas. A priori, parece que si la asignación de los mayores inóculos predichos por Poisson a las muestras más rápidas en alcanzar el nivel de detección es realista y debería ser la que más se aproxime a la precisión. Pero no puede garantizarse que la existencia en un pocillo de dos o más células signifique que comiencen a crecer antes. Cabe la posibilidad de que la célula más rápida en iniciar el desarrollo esté aislada en una muestra, sin compañeras. Solo puede afirmarse que es más probable que las muestras con mayor número de células iniciales contengan las células más rápidas en iniciar la multiplicación. Esta mayor probabilidad debería considerarse y, aunque no haya una certeza absoluta de la precisión del cálculo de la fase de latencia de acuerdo con esta premisa, aceptarla como la más fiable. Los investigadores que no acepten esta última, deberían utilizar la Distribución Truncada ya que ofrece una aproximación más realista que la de 1 única célula por pocillo, aunque pueda parecer muy artificial asumir que en todas las muestras existe una célula viable y una parte de otra, dado que siempre se trabajará con números decimales.

4.4 EFECTO DEL TAMAÑO DEL INÓCULO EN LA FASE DE LATENCIA

Puede parecer extraño el trabajar con inóculos tan pequeños, como estamos viendo, y el estudio del comportamiento de microorganismos aislados, de uno en uno. Pero puede ser más frecuente de lo que pueda pensarse que una sola bacteria -quizás patógena- se encuentre en un alimento y que haya sobrevivido a un tratamiento conservante determinado, circunstancias parejas a las que aquí se analizan. Al considerar células individualizadas se ha puesto de relieve la necesidad de evaluar cuantitativamente la variabilidad de su comportamiento, en especial la de su fase de latencia. En efecto, cuando se manejan poblaciones de miles de células, la determinación de la fase de latencia es bastante repetitiva y no porque sea la media de las fases de latencia de todos los miembros de dicha población sino porque es un reflejo de las células que tienen una fase de latencia más corta y, que, al comenzar su duplicación antes que las otras, pueden inundar de células hijas la población mientras que las lentas, quizás, no se hayan duplicado todavía. Cuantas más células formen el inóculo más probable será que haya células muy rápidas en iniciar la duplicación y, por

consiguiente, la fase de latencia de la población será menos variable. A esta afirmación puede ponerse un pero, ya que aún no se ha dilucidado si puede darse un efecto *quorum sensing* a esta tan pequeña escala, es decir, ¿existe algún “sistema de comportamiento social” de las bacterias que hacen que su fase de latencia se acorte conforme el tamaño del inóculo se agranda? Este hecho, que la fase de latencia es menos prolongada conforme se incrementa la cantidad de células que forman un inóculo, es bien conocido, tal como lo corroboran diversos estudios de Stephens y col. (1997), García de Fernando (2003) y Aguirre (2012) e incluso ha sido modelado (Métris y col., 2008). Trabajando con este modelo, y conociendo de antemano la distribución de las fases de latencia de un número n de células, puede predecirse desde un punto de vista exclusivamente probabilístico, qué fase o fases de latencia será(n) la(s) más probable(s) para las posibles poblaciones formadas por una, algunas, muchas o todas las n células. Pues bien, Aguirre y col. (2013a) aplicaron este modelo a la distribución de fases de latencia de *L. innocua* previamente calculadas experimentalmente y, a la vez, calcularon la fase de latencia real de diversos inóculos, de entre 10 y 50 células, y observaron que las fases de latencia predichas eran siempre más largas que las estimaciones experimentales, concluyendo que, muy probablemente el efecto del tamaño del inóculo no se debe solo a un efecto numérico, probabilístico, sino también a algo biológico, que muy posiblemente pueda tener su origen en un fenómeno del tipo *quorum sensing*. En suma, es obvio que el estudio de la variabilidad de la fase de latencia será útil para poder predecir el comportamiento microbiano en alimentos con una contaminación mínima de una sola célula o con poblaciones de unas pocas células.

4.4.1 Distribución gamma de la fase de latencia de células individuales

La distribución gamma pertenece a la familia de las distribuciones exponenciales y es una de las que mejor describe matemáticamente la variabilidad biológica de la fase de latencia (Miranda, 2003; Aguirre, 2012) aparte de estar generalmente aceptada por muchos y competentes autores como la que mejor se ajusta a la realidad de las fases de latencia (Métris, 2003; Métris y col., 2003; Métris y col., 2004; Elfving y col., 2004; Pin, 2004). Esta distribución se caracteriza por dos parámetros la forma (β) y la tasa (λ) o su inversa, la escala (Θ), que pueden calcularse a partir de la media y la varianza de los datos que forman la distribución según se ha visto en la sección 3.8.2.1. La Tabla 22, construida a partir de los datos reseñados en las Tablas 13-19, elegidos porque eran los

que más se aproximaban a 1 célula por pocillo, resume los parámetros definitorios de las distribuciones gamma a las que pueden ajustarse las fases de latencia calculadas en el presente trabajo. Se siguen calculando con las tres alternativas propuestas para el cálculo de la fase de latencia.

Microbiológicamente hablando y en los términos de la fase de latencia, los parámetros forma y escala tienen una interpretación biológica de acuerdo con Baranyi (2002). La “forma” viene a representar la cantidad de trabajo a realizar durante la fase de latencia y la “escala” da una idea de la velocidad a la que se realiza ese trabajo, aunque la contemplación de los datos expuestos en la Tabla 22 realmente no reflejan intuitivamente esa idea.

Tabla 22.

Parámetros de la distribución gamma de fases de latencias, calculados con datos obtenidos experimentalmente, remarcados en las tablas 13-19, y las ecuaciones 31 y 32.

Bacterias-condiciones de crecimiento	Inactivación lograda (-log ufc/muestra)	1 Célula		Distribución de Poisson		Distribución de Poisson Truncada	
		Forma (β)	Tasa (λ)	Forma (β)	Tasa (λ)	Forma (β)	Tasa (λ)
<i>E. faecalis</i> TSB, pH ~7,37	0,0	19,6	2,0	32,4	3,2	21,7	2,1
	1,8	16,5	0,9	26,7	1,4	18,4	1,0
	2,9	6,3	0,2	7,7	0,3	6,7	0,2
	3,7	5,0	0,1	5,6	0,1	5,2	0,1
<i>L. innocua</i> TSB, pH ~7,20	0,0	16,8	1,8	25,0	2,5	19,8	1,9
	1,8	24,7	1,2	41,4	2,0	27,2	1,3
	3,2	22,4	1,0	33,8	1,4	24,6	1,0
	3,9	12,6	0,3	13,9	0,3	13,0	0,3
TSB, pH ~5,20	0,0	4,2	0,5	13,1	1,1	7,6	0,6
	2,0	3,8	0,2	10,2	0,5	5,3	0,3
	2,9	3,7	0,2	8,4	0,3	5,1	0,2
	4,1	9,8	0,2	12,5	0,2	11,1	0,2
<i>P. fluorescens</i> TSB, pH ~7,28	0,0	11,0	0,6	13,2	0,7	11,5	0,6
	3,0	24,1	0,7	28,5	0,8	25,0	0,7
	3,1	16,8	0,4	18,6	0,4	17,2	0,4
	4,1	16,6	0,3	18,0	0,3	16,9	0,3
TSB, pH ~5,12	0,0	48,7	1,7	78,9	2,7	52,1	1,8
	2,7	21,1	0,6	27,3	0,8	22,1	0,6
	3,5	13,9	0,3	16,8	0,4	14,6	0,3
	4,2	7,3	0,2	8,4	0,2	7,7	0,2
<i>S. Enteritidis</i> TSB, pH ~7,24	0,0	4,8	0,8	10,4	1,6	6,3	0,9
	3,2	3,2	0,2	4,3	0,3	3,6	0,3
	2,1	4,0	0,2	5,0	0,3	4,3	0,2
	4,6	5,0	0,2	6,0	0,2	5,3	0,2
TSB, pH ~5,24	0,0	2,5	0,3	4,7	0,5	3,4	0,3
	2,8	2,5	0,2	3,6	0,2	3,0	0,2
	3,2	4,0	0,2	4,8	0,2	4,2	0,2
	4,0	4,9	0,2	6,3	0,2	5,3	0,2

Así, si el lector se fija en las formas de *E. faecalis*, en cualquiera de las tres alternativas, comprobará que cuanto mayor ha sido el grado de inactivación, la forma disminuye mientras la escala –recuérdese que es la inversa de la tasa- va en aumento, con lo que, de acuerdo con Baranyi (2002) haría falta menos trabajo para concluir la fase de latencia y se haría a una velocidad mayor. En realidad, deben contemplarse ambos parámetros conjuntamente y solo cuando se considera una de las dos constantes,

debería considerarse la tendencia del otro. Es decir, si la forma es constante, el incremento de la escala reflejaría una mayor velocidad y viceversa, para una escala constante, al aumentar la forma, significaría una cantidad de trabajo superior. Dicho esto, no intente el lector sacar conclusiones de las formas y las escalas aquí expuestas porque, en realidad, la distribución depende de ambos parámetros y los dos, al unísono, van a conformar la anchura y la altura de la distribución. Más adelante se muestran las distribuciones ajustadas con los datos experimentales y se podrá comprobar este extremo. Obsérvese como se van aplanando las distribuciones (Figura 51) conforme se intensifica el tratamiento térmico. En suma, de los datos de la Tabla 22 debe deducirse que cuanto menor es la tasa, más ancha es la distribución, es decir, la fase de latencia será más variable, mientras que el parámetro forma solo indica que, al ser siempre mayor de la unidad, la distribución presenta un máximo que, claro está, coincide con el valor más probable de la fase de latencia.

¿Qué aporta la distribución gamma al estudio de la fase de latencia de microorganismos? El *quid* de la cuestión es que esta herramienta matemática permite una aproximación probabilística. Cualquier distribución, ya sea normal o gamma, asocia una variable, como ha sido el número de supervivientes o el grado de inactivación alcanzado y, ahora, la fase de latencia, a una probabilidad, y esta probabilidad es crítica para el análisis de peligros y puntos críticos de control. Las Figuras que se muestran a continuación exponen las distribuciones gamma de las fases de latencia de las cuatro bacterias en estudio al crecer a pH neutro y ácido y tras haber sobrevivido a diferentes tratamientos acidificantes. Se muestran (Figuras 51-57) las distribuciones obtenidas a partir de las tres alternativas para decidir cuál era la carga inicial de microorganismos discutidas más arriba. La observación de cualquiera de ellas permite entender el extremo probabilístico y las posibilidades que ofrece a la industria alimentaria para decidir con un criterio científico y matemático la vida útil de un producto. A cada fase de latencia, o mejor, a cada intervalo de fases de latencia, le corresponde una probabilidad, que puede calcularse sustituyendo los valores de λ y κ que correspondan en la Ecuación:

$$f(x) = \frac{\lambda e^{-\lambda x} (\lambda x)^{\kappa-1}}{\Gamma(\kappa)} \quad (28)$$

De esta manera puede estimarse qué probabilidad se tiene de que la fase de latencia sea menor de una determinada o, lo que es lo mismo y más útil, cuántos envases de un lote presentarán esa fase de latencia y menores. Recuérdese que si se conoce la μ_{max} del microorganismo o microorganismos presentes en el producto en las condiciones de almacenamiento y distribución, puede calcularse el tiempo necesario para que este o estos alcancen una tasa que marcará la vida útil del producto, pero es imprescindible conocer el tiempo que transcurre entre la producción (proceso conservante) y el momento en que comienza la multiplicación del microorganismo en cuestión, es decir, la fase de latencia, para sumarla. La vida útil del producto, desde un punto de vista exclusivamente microbiológico, debería marcarse en función de qué porcentaje de muestras (envases) sería admisible que alcanzase la tasa inaceptable de microorganismos.

Si se conoce la carga microbiana inicial de una materia prima, el efecto microbicida del tratamiento conservante que se le aplica (léase acidificación en esta Tesis) y la variabilidad de ese efecto microbicida (distribución normal) (Figuras 31-34 y Tabla 7), puede calcularse la probabilidad de que queden un número n de supervivientes. Ahora también conocemos la fase de latencia media de esos n microorganismos por separado o conjuntamente, así como su variabilidad (desviación estándar); además, tenemos las herramientas matemáticas adecuadas para calcular la probabilidad asociada a cada una de dichas fases, con lo que, si también sabemos μ_{max} , tenemos todos los datos para ajustar con precisión la vida útil del alimento en cuestión con unas bases científicas, estadísticas y probabilísticas.

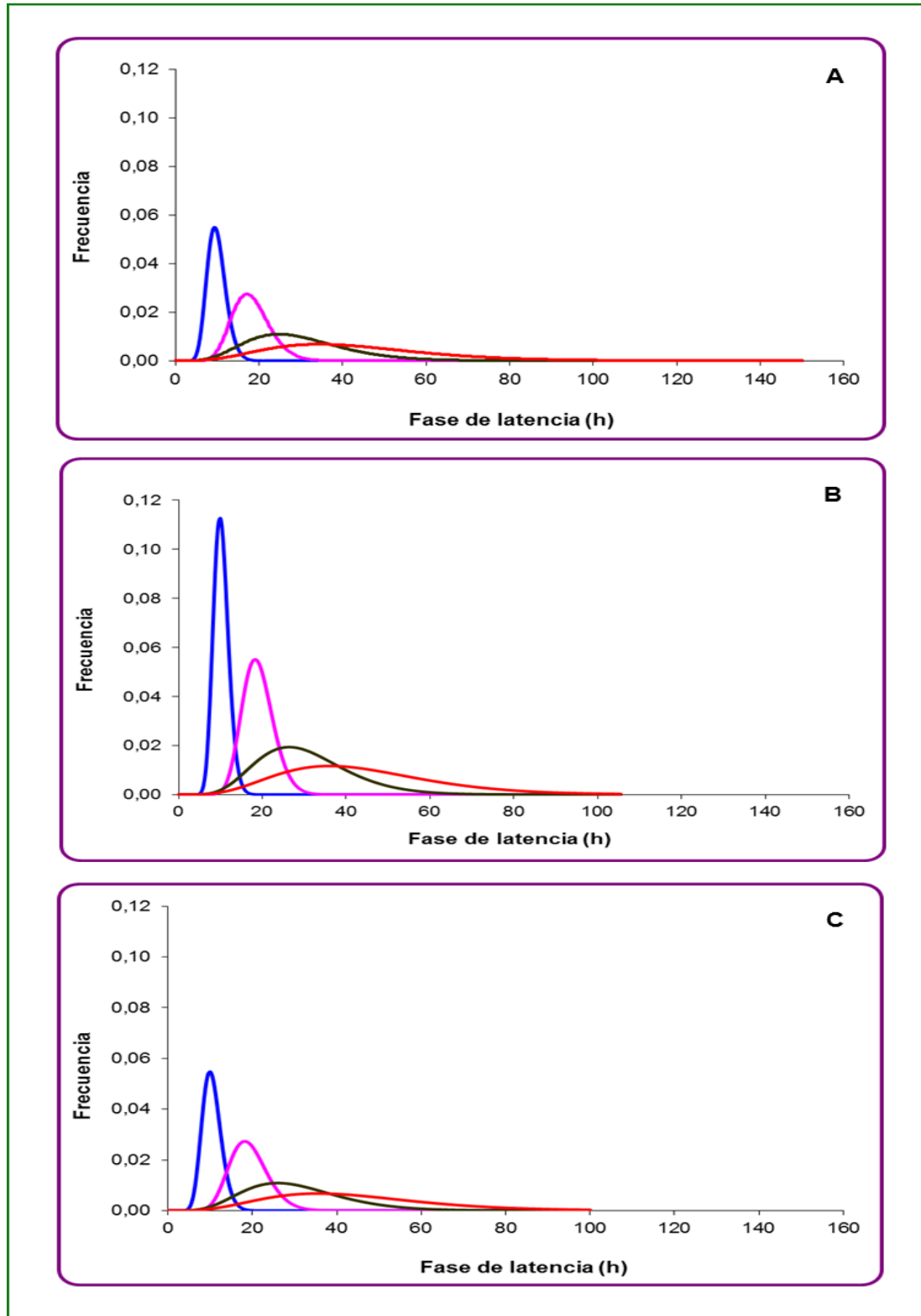


Figura 51. Distribuciones de frecuencia de las fases de latencia de *Enterococcus faecalis* en TSB neutro a 20°C, después de diferentes tratamientos acidificantes que redujeron 0 (azul); 1,8 (rosa); 2,9 (verde oliva) y 3,7 (roja) ciclos logarítmicos, asumiendo un inóculo de una célula por muestra (A), una distribución de Poisson del número de células por muestra (B) y una distribución de Poisson Truncada del número de células por muestra (C). Las distribuciones corresponden con los datos reseñados en la Tabla 13.

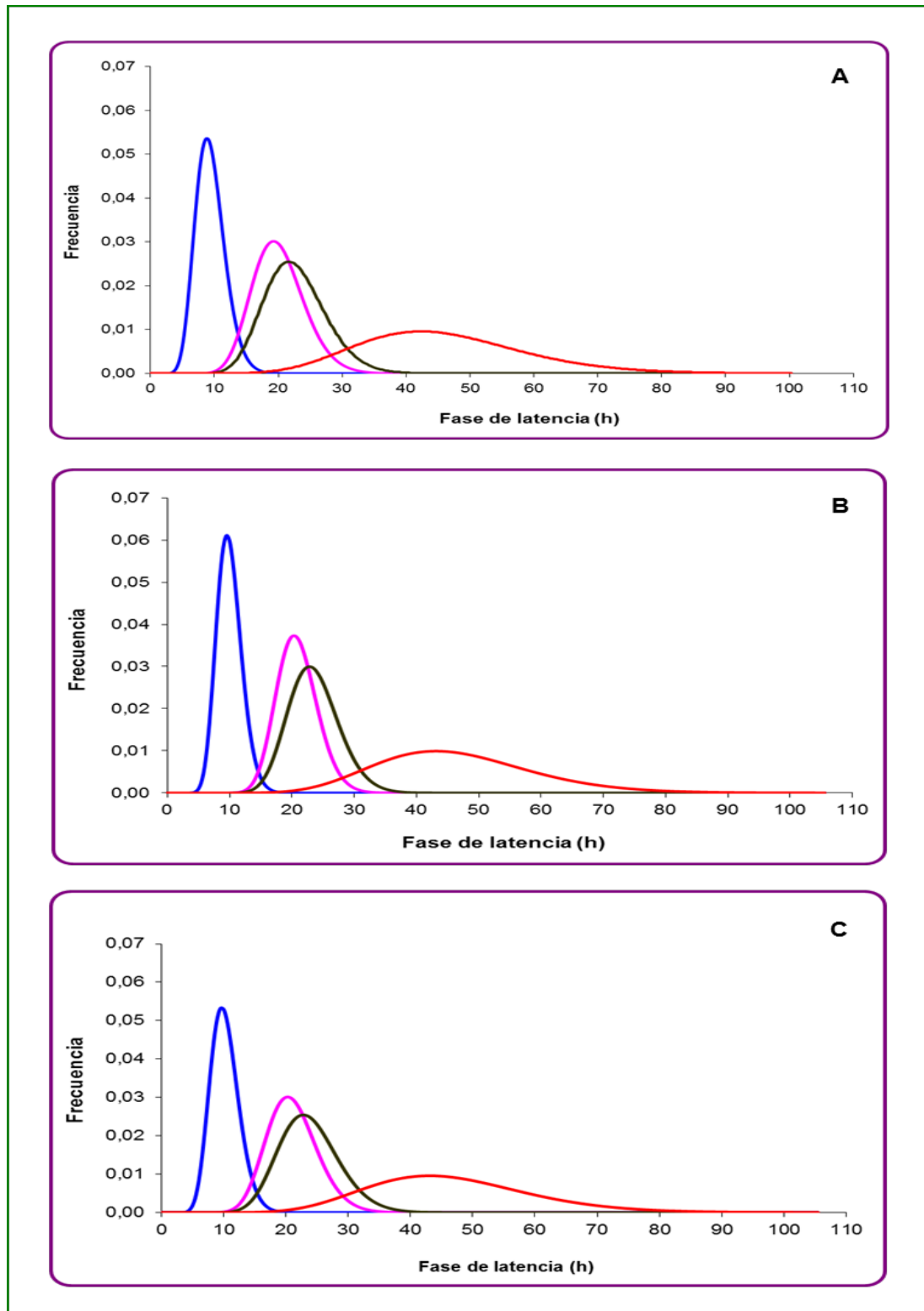


Figura 52. Distribuciones de frecuencia de las fases de latencia en *Listeria innocua* en TSB neutro a 20°C, después de diferentes tratamientos acidificantes que redujeron 0 (azul); 1,8 (rosa); 3,2 (verde oliva) y 3,9 (roja) ciclos logarítmicos, asumiendo un inóculo de una célula por muestra (A), una distribución de Poisson del número de células por muestra (B) y una distribución de Poisson Truncada del número de células por muestra (C). Las distribuciones corresponden con los datos reseñados en la Tabla 14.

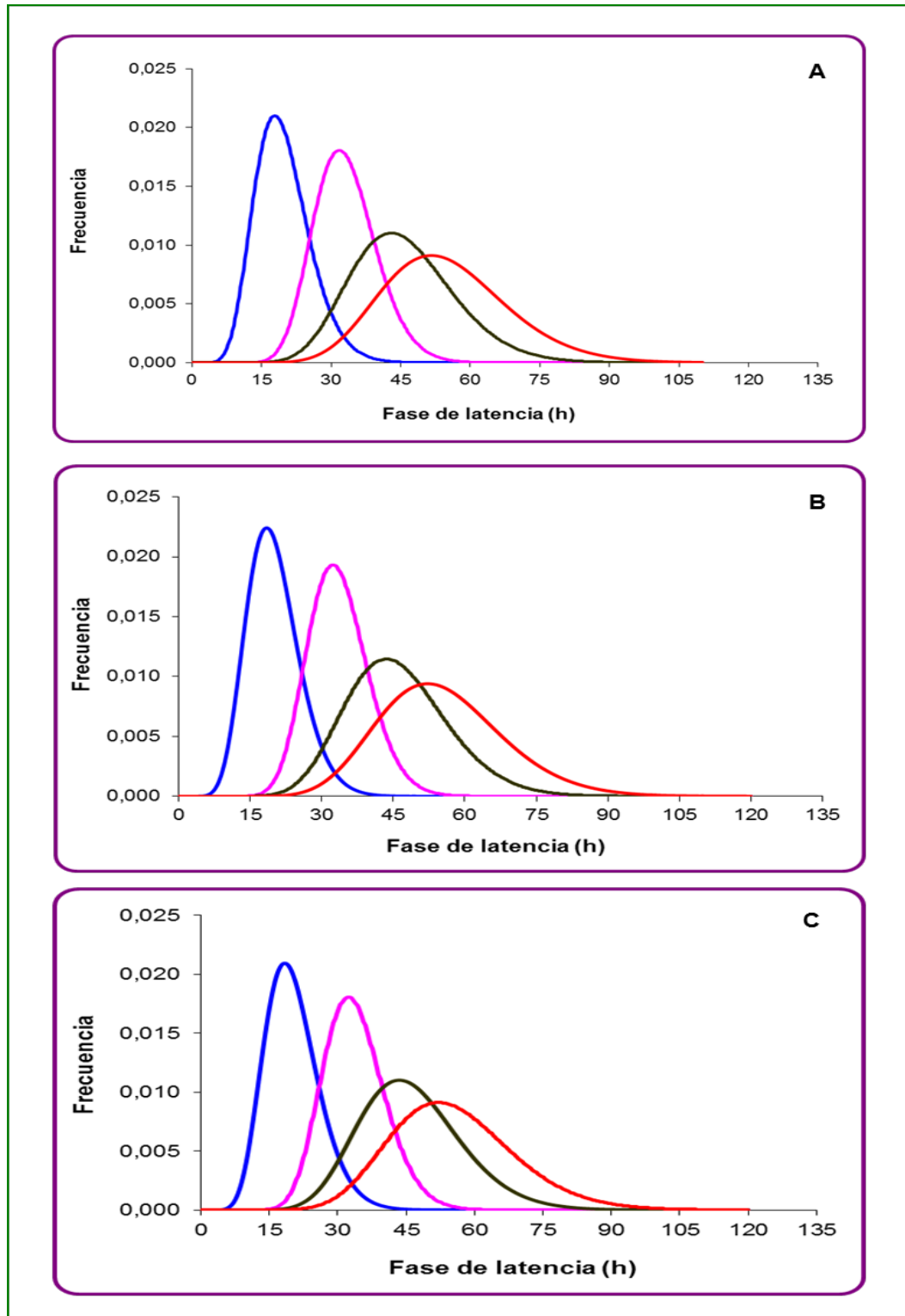


Figura 53. Distribuciones de frecuencia de las fases de latencia de *Pseudomonas fluorescens* en TSB neutro a 20°C, después de diferentes tratamientos acidificantes que redujeron 0 (azul); 3,0 (rosa); 3,1 (verde oliva) y 4,1 (roja) ciclos logarítmicos asumiendo un inóculo de una célula por muestra (A), una distribución de Poisson del número de células por muestra (B) y una distribución de Poisson Truncada del número de células por muestra (C). Las distribuciones corresponden con los datos reseñados en la Tabla 15.

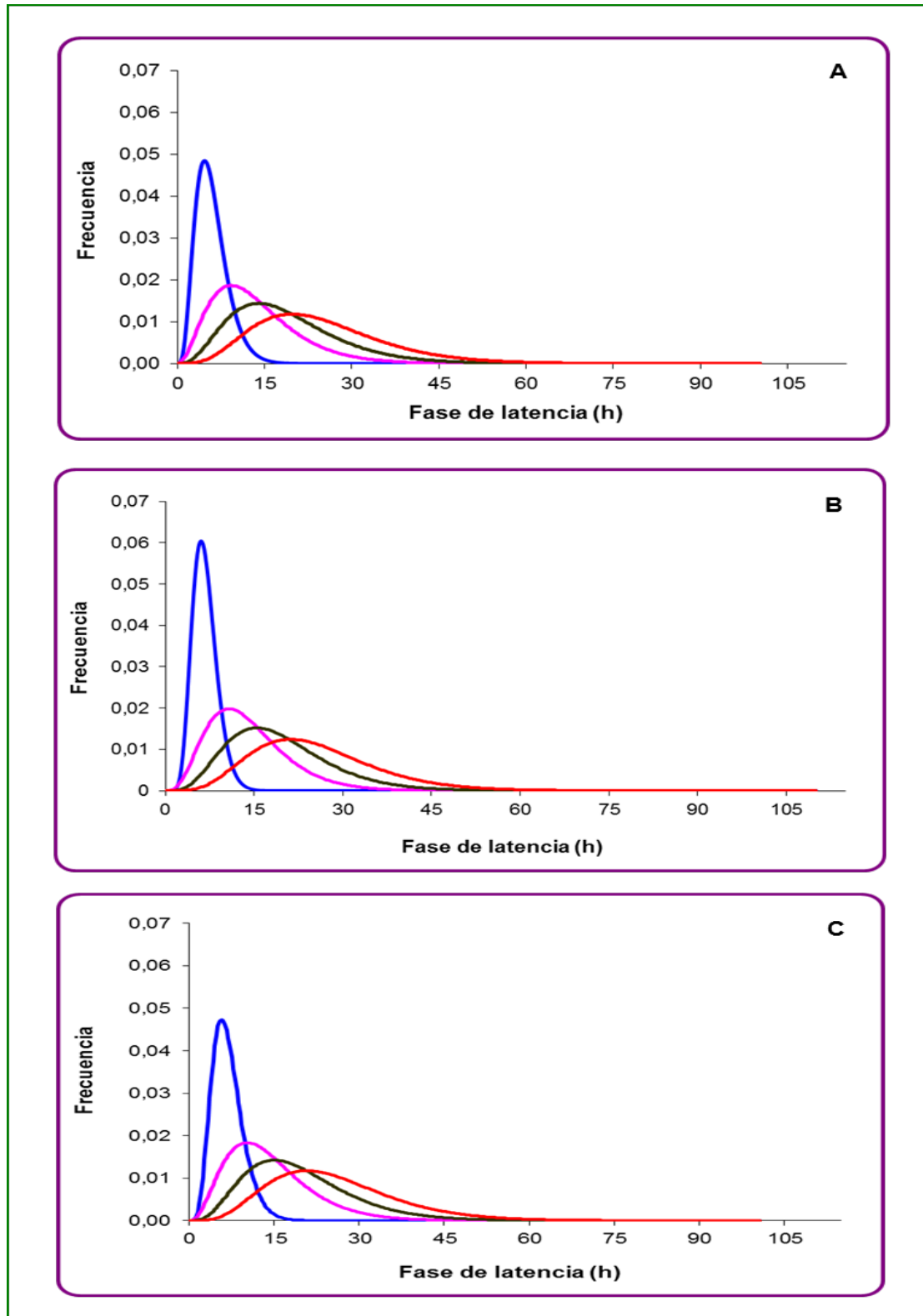


Figura 54. Distribuciones de frecuencia de las fases de latencia de *Salmonella* Enteritidis en TSB neutro a 20°C, después de diferentes tratamientos acidificantes que redujeron 0 (azul); 2,1 (verde oliva); 3,2 (rosa) y 4,6 (roja) ciclos logarítmicos asumiendo un inóculo de una célula por muestra (A), una distribución de Poisson del número de células por muestra (B) y una distribución de Poisson Truncada del número de células por muestra (C). Las distribuciones corresponden con los datos reseñados en la Tabla 16.

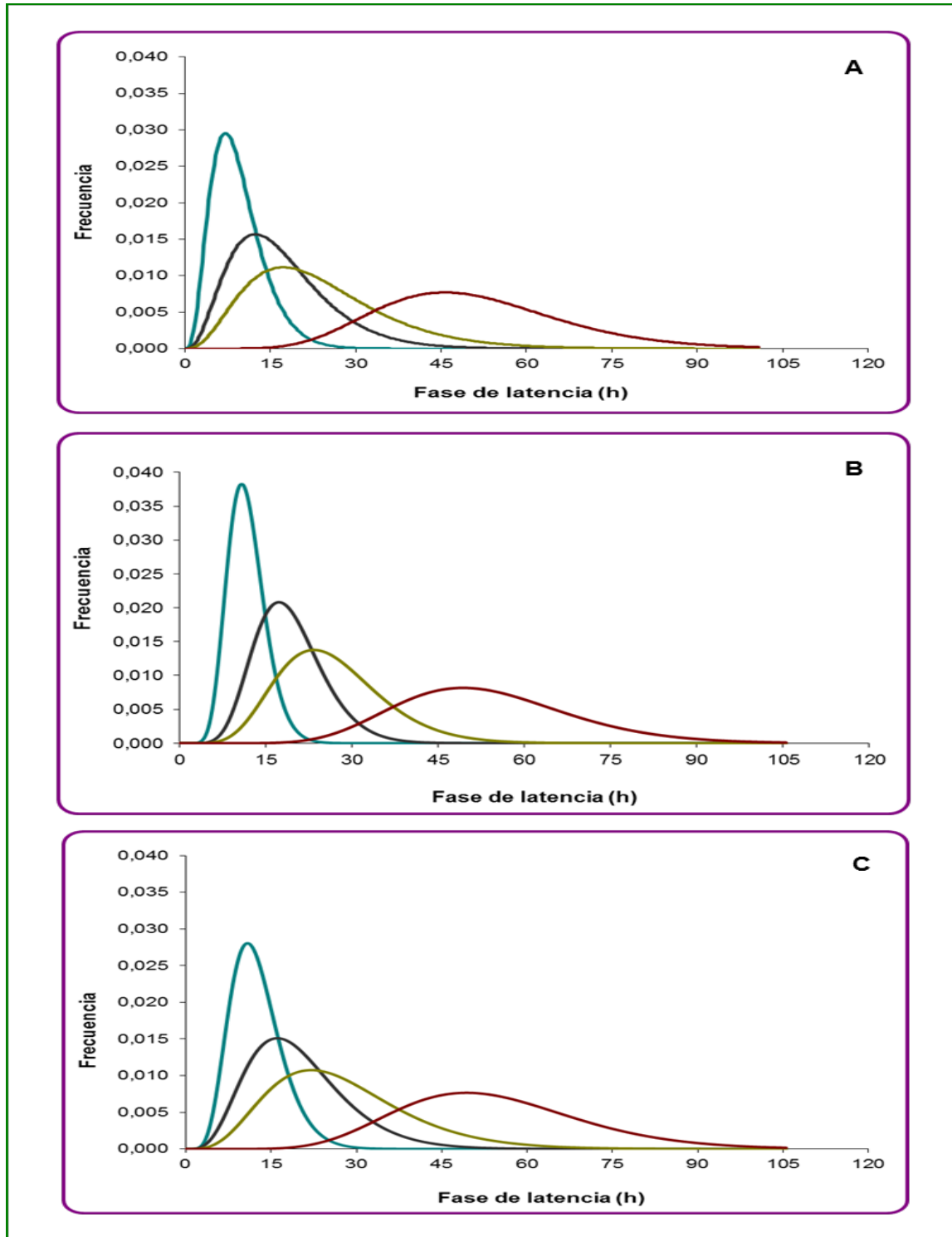


Figura 55. Distribuciones de frecuencia de las fases de latencia en *Listeria innocua* en TSB ácido a 20°C, después de diferentes tratamientos acidificantes que redujeron 0 (verde mar); 2,0 (gris); 2,9 (verde lima) y 4,1 (marrón) ciclos logarítmicos asumiendo un inóculo de una célula por muestra (A), una distribución de Poisson del número de células por muestra (B) y una distribución de Poisson Truncada del número de células por muestra (C). Las distribuciones corresponden con los datos reseñados en la Tabla 17.

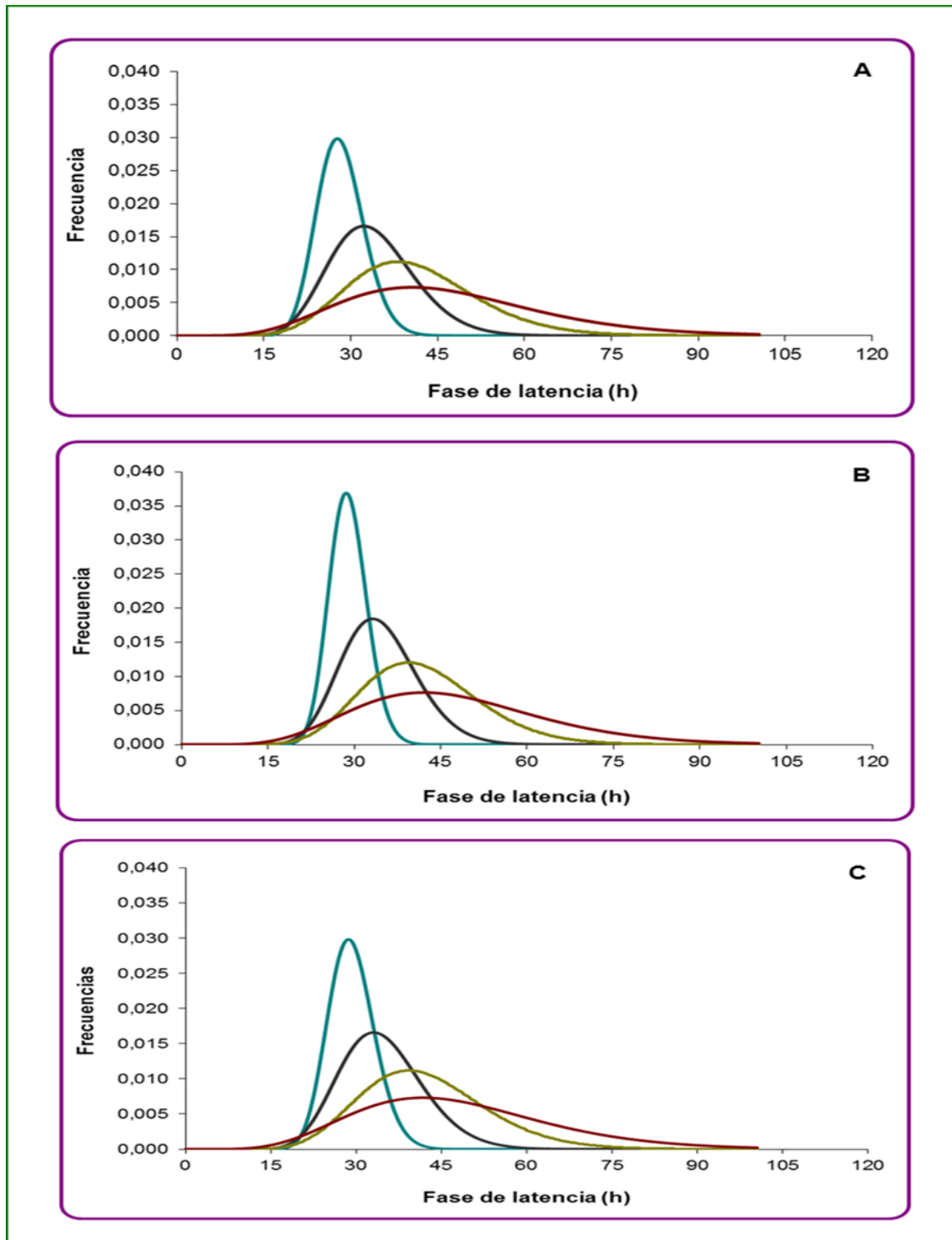


Figura 56. Distribuciones de frecuencia de las fases de latencia en *Pseudomonas fluorescens* en TSB ácido a 20°C, después de diferentes tratamientos acidificantes que redujeron 0 (verde mar); 2,7 (gris); 3,5 (verde lima) y 4,2 (marrón) ciclos logarítmicos asumiendo un inóculo de una célula por muestra (A), una distribución de Poisson del número de células por muestra (B) y una distribución de Poisson Truncada del número de células por muestra (C). Las distribuciones corresponden con los datos reseñados en la Tabla 18.

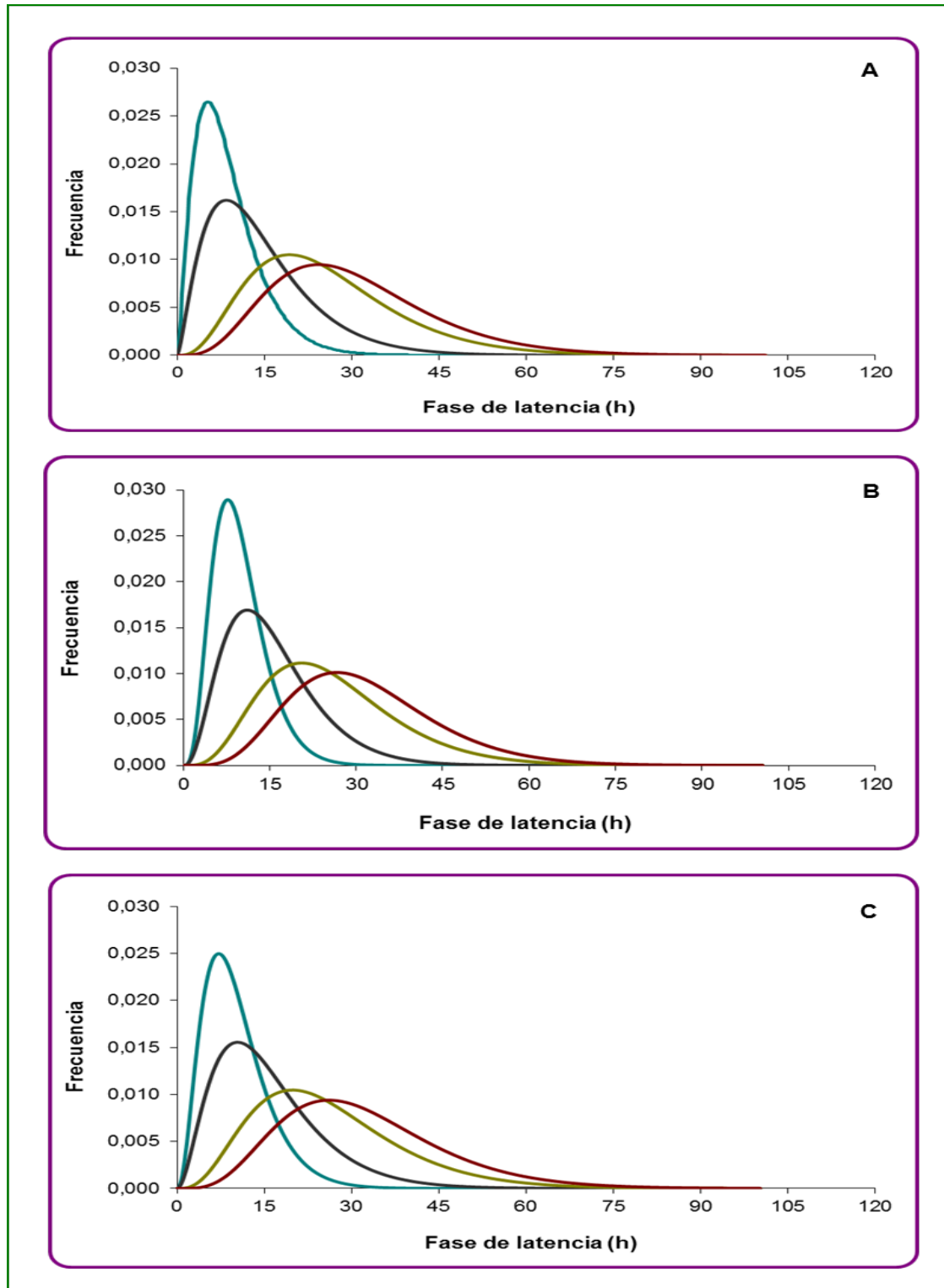


Figura 57. Distribuciones de frecuencia de las fases de latencia en *Salmonella* serovar Enteritidis en TSB ácido a 20°C, después de diferentes tratamientos acidificantes que redujeron 0 (verde mar); 2,8 (gris), 3,2 (verde lima) y 4,0 (marrón) ciclos logarítmicos asumiendo un inóculo de una célula por muestra (A), una distribución de Poisson del número de células por muestra (B) y una distribución de Poisson Truncada del número de células por muestra (C). Las distribuciones corresponden con los datos reseñados en la Tabla 19.

Aunque, a simple vista, algunas de las distribuciones obtenidas pueden parecer campanas de Gauss, si se presta atención se observará que la parte de la derecha de las curvas se extienden más que la de la izquierda, haciendo que los valores moda o más probables de fase de latencia estén más cerca del mínimo que del máximo predicho. Las fases de latencia mínimas y máximas observadas, es decir, no predichas sino reales, pueden observarse en las Tablas 13-19 y podrá comprobarse que las medias son más cercanas a las fases de latencia más cortas. Esto es típico de cualquier distribución gamma, siempre que su forma sea mayor de 1. En realidad, los datos recabados se ajustaron a una distribución gamma, es decir, la construcción de estas gráficas (51-57) y el aspecto de las curvas es una imposición matemática, por supuesto no caprichosa, ya que se admite que esta distribución es la que mejor se ajusta a la realidad de las fases de latencia (Métris, 2003; Métris y col., 2003; Métris y col., 2004; Elfving y col., 2004; Pin, 2004). ¿Qué consecuencias prácticas tiene que el valor de la fase de latencia más probable esté más próximo al mínimo que al máximo? En realidad, pocas. La más o menos larga cola de la derecha que predice fases de latencia dilatadas en el tiempo no es relevante para la industria. Es mucho más importante el piquito de la izquierda, esas fases de latencia más cortas y no muy probables son las que determinarán la vida útil del alimento. Será ese pequeño porcentaje de muestras las que alcanzarán una tasa infectiva -si de un patógeno se tratara- o el nivel de alteración, antes. Si la industria manejase estas distribuciones, conociera la probabilidad de supervivencia de sus contaminantes al proceso conservante que aplique (ya sea acidificante o de otra naturaleza) y la fase de latencia de los posibles microorganismos que puedan haber sobrevivido y su tasa máxima de crecimiento, podría fijar la fecha de caducidad o de consumo preferente de acuerdo con el riesgo que quiera asumir, incluso podría acercarse al riesgo cero, intentando que la vida útil quede fuera por la izquierda de la distribución gamma que puede formarse, sumando a la fase de latencia más corta predicha, el tiempo necesario para ese envase -de fase latencia súper corta-, llegue al nivel de alteración o concentración de un patógeno inaceptable en las condiciones habituales de almacenamiento y siempre considerando la naturaleza del alimento. Este supuesto sería perfectamente aplicable si se conociese con exactitud la carga microbiana máxima que puede sobrevivir a un tratamiento, ya que sería esa carga la que antes entraría en fase exponencial y, por tanto, la que marcaría el límite mínimo para el establecimiento de una vida útil “segura”.

Una vez dicho esto, analicemos las distribuciones obtenidas. Es obvio que conforme las bacterias han sobrevivido a tratamientos acidificantes más intensos, la probabilidad de encontrar microorganismos con fases de latencia cortas disminuye, la fase de latencia más frecuente se desplaza hacia la derecha, es decir se alarga, y la probabilidad de encontrar células con fases de latencia muy prolongadas aumenta. Todos los lotes de microorganismos que no sufrieron un tratamiento acidificante (sin ningún estrés) mostraron unas fases de latencia que podrían catalogarse de bastante homogéneas, con unas distribuciones notablemente más estrechas que el resto. Piénsese que estas bacterias no estresadas, supuestamente no han sufrido daños, por lo que durante su fase de latencia no hará falta repararlos y esta representará solo el tiempo necesario para adaptarse a las nuevas condiciones (muy similares a las precedentes) y el imprescindible para la síntesis de compuestos que precisen para su duplicación. En suma, esta variabilidad puede definirse como inherente a ese microorganismo y no parece fruto de artificios técnicos o de un manejo heterogéneo, etc.

La comparación de las distribuciones de los diferentes microorganismos demuestra comportamientos dispares. Mientras las fases de latencia de *E. faecalis* y *S. Enteritidis* (creciendo en pH neutro) tratadas con ácido son muy variables en comparación con las de los no estresados de su misma especie, las de *L. innocua* con un estrés intermedio (hasta 3 ciclos de reducción logarítmica) y las de *P. fluorescens* no se diferencian tanto, lo que puede indicar que los daños en estas dos últimas son menores y los tiempos necesarios para repararlos y capacitarse para la duplicación más homogéneos. En cambio, a pH ácido de crecimiento, las diferencias inter-especie son menores; la distribución gamma que predice las fases de latencia de las bacterias no estresadas son bastante afiladas en los tres casos, mientras que se van achatando conforme el estrés ácido previo se hace más intenso. Observaciones similares a las aquí señaladas se han publicado tras irradiar a las mismas cepas con electrones acelerados (Aguirre y col., 2011), tras tratar térmicamente *L. innocua* (Aguirre y col., 2013a) y tratar por calor e irradiación a *B. cereus* (Aguirre y col., 2013b).

Finalmente, comparemos las distribuciones obtenidas a partir de las tres alternativas de estimar el inóculo inicial, aunque no ofrezcan unas diferencias remarcables a primera vista. Desde un punto de vista académico y de precisión, la adjudicación de los mayores inóculos a las muestras con tiempos de detección más

cortos o, al menos, considerar la distribución Truncada de Poisson, parece recomendable. Para facilitar la comparación se ha construido la Figura 58, que recoge las distribuciones mostradas en la precedente 51, pero reorganizadas para facilitar dicha comparación.

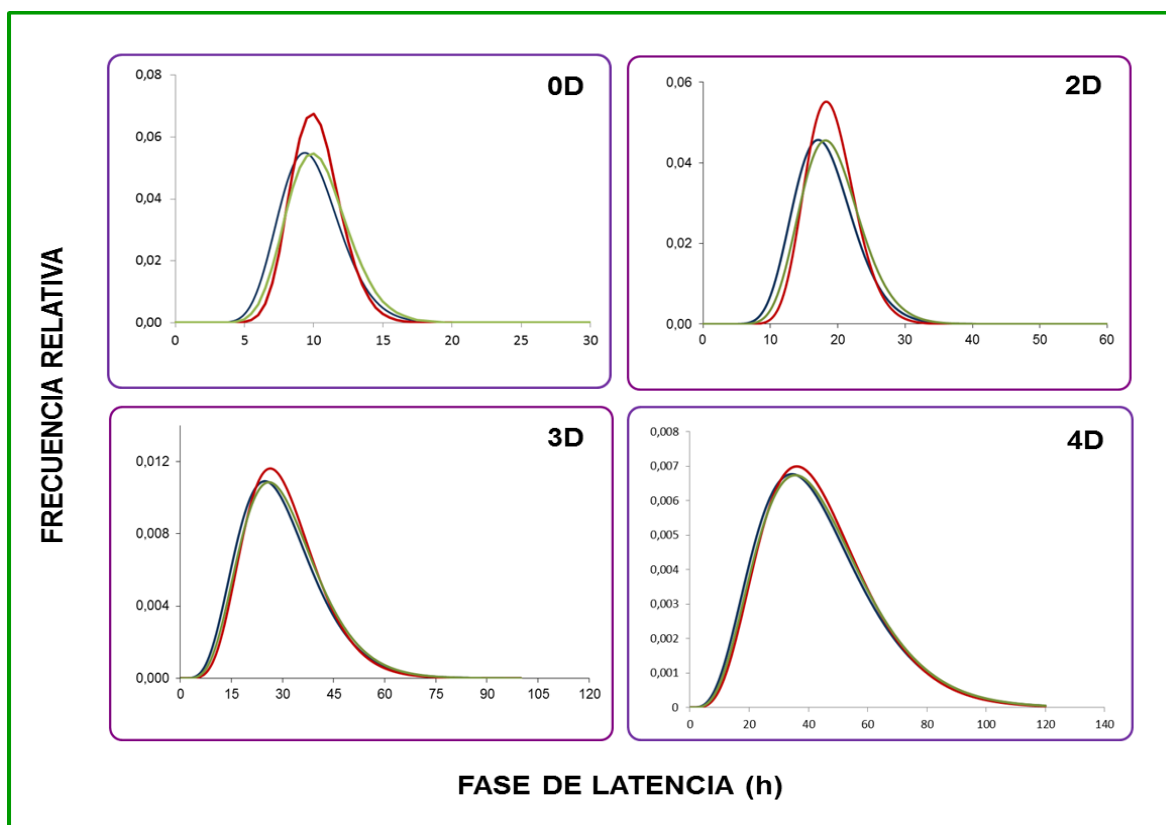


Figura 58. Distribuciones gamma de la fase de latencia de *Enterococcus faecalis* en TSB de pH neutro (~7,37) a 20°C, tras diversos tratamientos inactivantes, desde 0 a 4 ciclos logarítmicos, asumiendo un inóculo de una célula por muestra (azul), una distribución de Poisson del número de células por muestra (roja) y una distribución de Poisson Truncada del número de células por muestra (verde).

La observación de las distribuciones resultantes (Figura 58) a partir de las tres asunciones permite deducir, en primer lugar su semejanza. No parece que vaya a cometerse un error considerable si se aplicara cualquiera de ellas; se aprecia que la curva roja (Distribución de Poisson, es decir, la que asume que las muestras tienen un número diferente de células) es algo más aguda y alta que las otras dos, que son casi idénticas, solo que la verde (Poisson Truncada) queda ligeramente desplazada hacia la derecha prediciendo unas fases de latencia un poco más largas que las del supuesto de que todas las muestras contuvieran una sola célula.

Pero si fijamos nuestra atención en las fases de latencia más cortas, las que más nos importan desde el punto de vista de la vida útil de los alimentos, quizás lleguemos a conclusiones diferentes. La Figura 59 se ha creado para facilitar esta tarea.

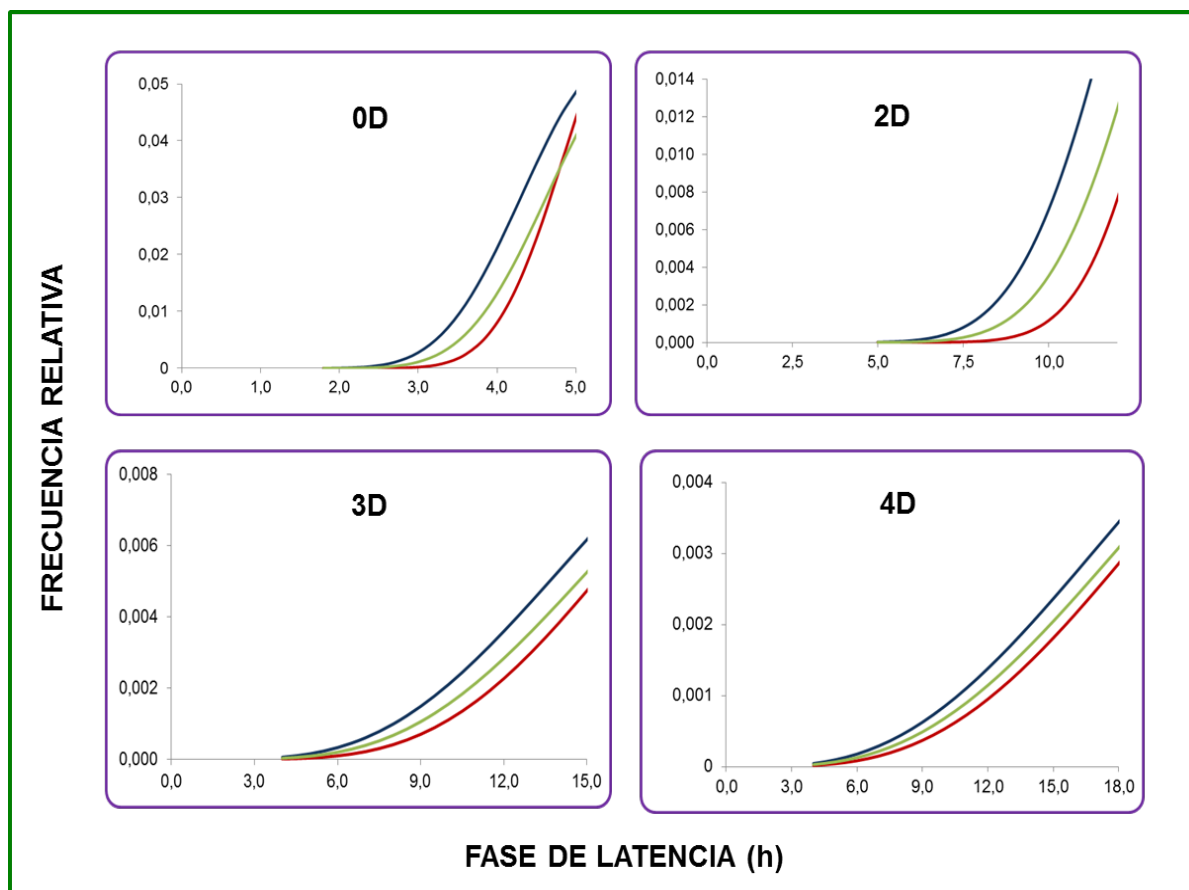


Figura 59. Detalle de las distribuciones gamma (de la figura 58) de las fases de latencia más cortas de *Enterococcus faecalis* en TSB de pH neutro (~7,37) a 20°C, tras diversos tratamientos inactivantes desde 0 a 4 ciclos logarítmicos, asumiendo un inóculo de una célula por muestra (azul), una distribución de Poisson del número de células por muestra (roja) y una distribución de Poisson Truncada del número de células por muestra (verde).

La curva azul (1 célula por muestra) es la que predice una mayor frecuencia de muestras con fases de latencia más cortas, con lo que su aplicación redundaría en una situación más segura, mientras que la aplicación del modelo predictivo logrado al suponer cargas iniciales distintas para cada muestra asumiría más riesgos, ya que sus predicciones son de fases de latencia cortas menos probables. Quizás, la aplicación de la Poisson Truncada pudiera ser la más acertada porque, en primer lugar, es algo más realista que suponer que en cada muestra existiera solo 1 célula y, en segundo, arriesga

menos que el supuesto más veraz de que en cada muestra exista un número diferente de viables.

No se muestran las distribuciones de las fases de las fases de latencia del resto de microorganismos agrupadas como en las Figuras 58 y 59 debido a su similitud con estas y que de ellas podrían extraerse las mismas conclusiones.

4.4.2 Comparación de las distribuciones de las fases de latencia

Considerando que las fases de latencia presentaban un mejor ajuste con la distribución gamma, para comparar dichas distribuciones hubo que recurrir al test de permutación para comparar las fases de latencia -y su variabilidad- calculadas en este trabajo. Este test compara, desde un punto de vista estadístico, múltiples muestras “no normales” como por ejemplo fases de latencia. Además este test agrega la corrección de Holm-Bonferroni, necesaria para las comparaciones múltiples realizadas dado el número elevado de muestras manejadas en la presente Tesis. Esta corrección consiste en ajustar el valor-*p* de significancia estadística. En la práctica, el test de permutación recalcula los valores-*p* y considera que es significativo siempre que sea menor que un determinado valor *alpha*, al que convencionalmente se le asigna el valor de $\alpha = 0,05$. Este paso se repite *n* veces, dependiendo el valor de *n* de la magnitud de la base de datos con la que se trabaja y del número de hipótesis que se contrastan, y a cada hipótesis le corresponde una determinada probabilidad de ser considerada como verdadera o falsa. Debe señalarse que el test de permutación viene acompañado inevitablemente de una multitud de suposiciones e interpretaciones. De ahí que ninguna de las múltiples comparaciones que lleva a cabo puede ser considerada en términos absolutos; su evaluación e interpretación debe entenderse como un paso más en el intento de explicar y cuantificar la variabilidad existente en la fase de latencia.

Las distribuciones comparadas son las mostradas en las Figuras 51-57 construidas a partir de los datos experimentales expuestos en las Tablas 13, 14, 15, 16, 17, 18 y 19 y que se corresponden con los experimentos que más se acercaron al número ideal de 1 célula por muestra y que se remarcen en las Tablas.

Se compararon las fases de latencia de los cuatro microorganismos en estudio (*E. faecalis*, *L. innocua*, *P. fluorescens* y *S. serovar Enteritidis*) supervivientes a diferentes

intensidades de tratamiento acidificante en TSB con 0, 2, 3 y 4 reducciones logarítmicas. Las diferentes comparaciones múltiples fueron: entre tratamientos, entre microorganismos y entre pHs de crecimiento [neutro (~7,2 y ácido (~5,2)].

Tabla 23.

Comparaciones múltiples de las fases de latencia de células individuales tras diferentes grados de inactivación acidificante, calculadas siguiendo la alternativa “Distribución de Poisson”. Las casillas marcadas con una x indican que los tratamientos que se comparan son significativamente diferentes al aplicar el test de Permutación ($p < 0,05$).

Microorganismos en TSB neutro	Nº de reducciones logarítmicas esperadas				
	0				
<i>Enterococcus faecalis</i>	0		2		
	2	x		3	
	3	x	x		4
	4	x	x	x	
<i>Listeria innocua</i>	0		2		
	2	x		3	
	3	x			4
	4	x	x	x	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0		2		
	2			3	
	3	x	x		4
	4	x	x		
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0		2		
	2	x		3	
	3	x			4
	4	x			
Microorganismos en TSB ácido	Nº de reducciones logarítmicas esperadas				
	0				
<i>Listeria innocua</i>	0		2		
	2	x		3	
	3	x	x		4
	4	x	x		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0		2		
	2	x		3	
	3	x	x		4
	4	x	x	x	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0		2		
	2	x		3	
	3	x	x		4
	4	x	x		

La Tabla 23 muestra los resultados de la comparación de las distribuciones de las fases de latencia para cada microorganismo por separado y para cada pH de crecimiento también por separado. Compara las distribuciones obtenidas a partir de la alternativa de que las muestras pudieran contener un número diferente de células (Distribución de Poisson). Salta a la vista que la casi totalidad de las comparaciones dieron como resultado que existían diferencias significativas, salvo en el caso de *S. Enteritidis*, en la que solo se apreciaron entre los lotes acidificados y el control cuando crecía a pH neutro; quizás la contemplación de la Figura 54 permita entender la agudeza del test y que realmente, aunque las distribuciones difieren evidentemente, sus diferencias no son suficientes para que el test le asigne la significancia.

De la Tabla 23, en resumen, debería colegirse que en las fases de latencias, es muy probable que vayan a ser significativamente distintas cuando los microorganismos han sobrevivido a un tratamiento acidificante en comparación con los que no han sido tratados y que, por regla general, la intensidad del tratamiento acidificante prolonga proporcionalmente la fase de latencia, pero no siempre va a haber diferencias significativas, dependiendo esto de la naturaleza del organismo y de la intensidad del tratamiento acidificante. Recuérdese que las inactivaciones incluidas en la Tabla 23 eran las esperadas y no las reales, indicadas en las Tablas correspondientes (13-19).

La Tabla 24 trata de comparar la respuesta de los diferentes microorganismos (en términos de sus fases de latencia) ante tratamientos acidificante similares. Al igual que la Tabla 23, compara las distribuciones obtenidas considerando que las muestras contenían un número diferente de células. De estas observaciones puede decirse que parece que a *E. faecalis* y *L. innocua* les afecta de forma similar la acidificación, cuando después crecen a pH neutro, mientras que la comparación del resto de pares tiende a remarcar diferencias significativas entre las fases de latencia de todos los microorganismos. En cambio no ocurre lo mismo cuando después de haber recibido el tratamiento acidificante, los microorganismos crecieron a pH en torno a 5,2. Sus fases de latencia fueron más similares, tal como se deduce de la menor incidencia de diferencias significativas entre ellas. Esta observación no puede decirse que fuera esperada ya que cuanto menos favorables son las condiciones de crecimiento, más costosas en términos energéticos deben ser las reparaciones necesarias y la adaptación

para alcanzar el estado fisiológico que permita el inicio de la multiplicación y esto podría conllevar a una mayor variabilidad.

Tabla 24.

Comparaciones múltiples entre fases de latencia de células individuales de *E. faecalis*, *L. innocua*, *P. fluorescens* y *S. serovar Enteritidis*, calculadas siguiendo la alternativa “Distribución de Poisson”, tras la aplicación de diferentes grados de inactivación acidificante. Las casillas marcadas con una x indican que los tratamientos que se comparan son significativamente diferentes al aplicar el test de Permutación ($p < 0,05$).

Microorganismo en TSB neutro	Nº de reducciones logarítmicas esperadas			
	0	2	3	4
<i>E. faecalis</i> vs. <i>L. innocua</i>			x	
<i>E. faecalis</i> vs. <i>P. fluorescens</i>	x	x		x
<i>E. faecalis</i> vs. <i>S. Enteritidis</i>		x		x
<i>L. innocua</i> vs. <i>P. fluorescens</i>	x	x	x	
<i>L. innocua</i> vs. <i>S. Enteritidis</i>		x	x	
<i>P. fluorescens</i> vs. <i>S. Enteritidis</i>	x		x	
Microorganismo en TSB ácido	Nº de reducciones logarítmicas esperadas			
	0	2	3	4
<i>L. innocua</i> vs. <i>P. fluorescens</i>				
<i>L. innocua</i> vs. <i>S. Enteritidis</i>		x		
<i>L. innocua</i> vs. <i>P. fluorescens</i>	x			

A continuación se compararon las distribuciones obtenidas a partir de otra alternativa de estimación del inóculo, con la Distribución de Poisson Truncada. En la Tabla 25 se comparan las distribuciones de las fases de latencia de los cuatro microorganismos por separado y para cada pH de crecimiento también por separado y, en la Tabla 26 se comparan las fases de latencia de los microorganismos ante tratamientos acidificante casi idénticos.

Piénsese en la mínima diferencia que, aparentemente, debería suponer el considerar como inóculo la distribución Truncada de Poisson y un número diferente de células que inician el crecimiento de acuerdo con la distribución de Poisson. Retómese el ejemplo incluido anteriormente. Sean 50 pocillos con crecimiento de un total de 100 muestras. De acuerdo con la Tabla 12, en 1 de los 50 pocillos existirían 4 células, en 3 pocillos, 3 células, en 12, 2 células y en los 35 restantes solo 1. Con estas cifras, la

distribución Truncada de Poisson arroja un número medio de células por muestra de 1,48 que surge de dividir el total de microorganismos existentes en los 50 pocillos con crecimiento por ese número de pocillos. Pues bien, esa “pequeña diferencia” provoca la presencia de 2 diferencias entre las Tablas 23 y 25, indicadas en esta última con un círculo en la casilla correspondiente. Esto puede tener dos lecturas. Por una parte, resaltar la importancia del cálculo de la fase de latencia cuando de micro-poblaciones se trata y por otra, la quizás no validez de este tipo de pruebas para comparar sucesos biológicos tan complejos como es la fase de latencia de los microorganismos. Recuérdese que el test de permutación con la corrección de Holm-Bonferroni genera un nivel de significancia diferente para cada comparación que realiza, dependiendo del número de, en este caso fases de latencia en distintas condiciones.

Lo mismo cabe decir de la comparación de las Tablas 24 y 26. En este caso hay incluso todavía más diferencias, hasta 3 sobre un total de 36, mientras que en el caso anterior fueron 2 las diferencias sobre un total de 35.




Tabla 25.

Comparaciones múltiples de las fases de latencia de los microorganismos indicados, calculadas con la alternativa “Distribución de Poisson Truncada”, tras diferentes grados de inactivación acidificante. Las casillas marcadas con una x indican que los tratamientos que se comparan son significativamente diferentes al aplicar el test de Permutación ($p < 0,05$). Se señalan con un círculo los pares de muestras cuya significancia cambia al calcular las fases de latencia con la Distribución de Poisson o con la Distribución Truncada de Poisson.

Microorganismos en TSB neutro	Nº de reducciones logarítmicas esperadas				
	0	2	3	4	
<i>Enterococcus faecalis</i>	0				
	2	x		3	
	3	x	x		4
	4	x	x	x	
<i>Listeria innocua</i>	0				
	2	x		3	
	3	x			4
	4	x	x	x	
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0				
	2			3	
	3	x	x		4
	4	x	x		
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0				
	2	x		3	
	3	x			4
	4	x			
Microorganismos en TSB ácido	Nº de reducciones logarítmicas esperadas				
	0	2	3	4	
<i>Listeria innocua</i>	0				
	2	x		3	
	3	x	●		4
	4	x	x		
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	0				
	2	x		3	
	3	x	●		4
	4	x	x	x	
<i>Salmonella</i> Enteritidis	0				
	2	x		3	
	3	x	x		4
	4	x	x		

Tabla 26.

Comparaciones múltiples entre fases de latencia de *E. faecalis*, *L. innocua*, *P. fluorescens* y *S. serovar Enteritidis*, calculadas con la alternativa “Distribución de Poisson Truncada”, tras la aplicación de diferentes grados de inactivación acidificante. Las casillas marcadas con una x indican que los tratamientos que se comparan son significativamente diferentes al aplicar el test de Permutación ($p < 0,05$). Se señalan con un círculo los pares de muestras cuya significancia cambia al calcular las fases de latencia con la Distribución de Poisson o con la Distribución Truncada de Poisson.

Microorganismo en TSB neutro	Nº de reducciones logarítmicas esperadas			
	0	2	3	4
<i>E. faecalis</i> vs. <i>L. innocua</i>			x	
<i>E. faecalis</i> vs. <i>P. fluorescens</i>	x	x		x
<i>E. faecalis</i> vs. <i>S. Enteritidis</i>	x 	x		x
<i>L. innocua</i> vs. <i>P. fluorescens</i>	x	x	x	
<i>L. innocua</i> vs. <i>S. Enteritidis</i>		x	x	
<i>P. fluorescens</i> vs. <i>S. Enteritidis</i>	x			
Microorganismo en TSB ácido	Nº de reducciones logarítmicas esperadas			
	0	2	3	4
<i>L. innocua</i> vs. <i>P. fluorescens</i>				
<i>L. innocua</i> vs. <i>S. Enteritidis</i>				
<i>L. innocua</i> vs. <i>P. fluorescens</i>	x			

La observación de ambas también revela diferencias difíciles de explicar, no apreciándose ninguna tendencia o razón que pudiera hacer vislumbrar algún motivo que ayude a entender los resultados de este test.

La autora de esta Tesis no puede dudar de la calidad y exactitud del test de permutación, pero quizás pueda cuestionársele para el análisis de sucesos biológicos, sujetos a una variabilidad inherente, porque al comparar múltiples muestras, se obliga a un nivel de significancia heterogéneo, ajustado por el propio test para cada comparación en función del número de muestras que se compara, lo que, quizás, pueda provocar diferencias o similitudes cuando se comparan dos lotes de datos obtenidos de una forma similar, pero no idéntica, como en el caso que nos ocupa.



Tabla 27.

Comparaciones entre fases de latencia de células individuales de *L. innocua*, *P. fluorescens* y *S. serovar Enteritidis* tras diferentes grados de inactivación acidificante, según la distribución de Poisson. Las casillas marcadas con x indican que los tratamientos que se comparan son significativamente diferentes al aplicar el test de Permutación ($p < 0,05$).

Microorganismos	Nº de reducciones logarítmicas esperadas				
	TSB neutro	TSB ácido			
<i>Listeria innocua</i>		0			
			2		
	0			3	
	2		x		4
	3			x	
	4				
<i>Pseudomonas fluorescens</i>		0			
			2		
	0	x		3	
	2				4
	3				
	4				x
<i>Salmonella</i> Enteritidis		0			
			2		
	0	x		3	
	2				4
	3			x	
	4				

Tabla 28.

Comparaciones entre fases de latencia de células individuales de *L. innocua*, *P. fluorescens* y *S. serovar Enteritidis* tras diferentes grados de inactivación acidificante, según la distribución de Poisson Truncada. Las casillas marcadas con x indican que los tratamientos que se comparan son significativamente diferentes al aplicar el test de Permutación ($p < 0,05$). Se señalan con un círculo los pares de muestras cuya significancia cambia al calcular las fases de latencia con la Distribución de Poisson o con la Distribución Truncada de Poisson.

Microorganismos	Nº de reducciones logarítmicas esperadas				
<i>Listeria innocua</i>	TSB neutro	TSB ácido			
		0		2	
	0	x 		3	
	2		x		4
	3			x	
	4				
<i>Pseudomonas fluorescens</i>	TSB neutro	TSB ácido			
		0		2	
	0	x		3	
	2				4
	3				
	4				x
<i>Salmonella</i> Enteritidis	TSB neutro	TSB ácido			
		0		2	
	0	x		3	
	2				4
	3			x	
	4				x 

5 CONCLUSIONES

Visto a la luz de la evolución, la biología es, quizás, la ciencia más satisfactoria e inspiradora. Sin esa luz, se convierte en un montón de hechos varios. Algunos interesantes o curiosos, pero sin formar ninguna visión conjunta (Theodosius Dobzhansky).

- PRIMERA.** La inactivación microbiana está sujeta a cierta variabilidad, que puede cuantificarse y modelarse matemáticamente.
- SEGUNDA.** La acidificación provoca una variabilidad por encima de la observada con tratamientos térmicos e irradiación.
- TERCERA.** Cuanto más intenso es un tratamiento conservante, menor es el número de supervivientes, pero aumenta la variabilidad de tal número.
- CUARTA.** La variabilidad de la inactivación no depende del acidulante o del sustrato sino que obedece, sobre todo, al efecto microbicida alcanzado.
- QUINTA.** La fase de latencia de los microorganismos está sujeta a cierta variabilidad, que puede cuantificarse y modelarse matemáticamente.
- SEXTA.** Cuanto más intensos son los tratamientos conservantes, entre ellos la acidificación, más larga y variable es la fase de latencia de los microorganismos supervivientes.
- SÉPTIMA.** La inclusión de la variabilidad en los modelos predictivos es fundamental para que las predicciones del comportamiento microbiano sean más realistas y seguras.
- OCTAVA.** La aplicación de modelos predictivos que contemplan la variabilidad de la inactivación y de la fase de latencia es útil para la estimación de la probabilidad de que una población microbiana se desarrolle. Quizás sea en los alimentos listos para el consumo y en los mínimamente procesados donde pueda sacarse más provecho de la aplicación de tales modelos.
- NOVENA.** Es obvio que cualquier plan de análisis de riesgos y control de puntos críticos debe considerar la variabilidad de la inactivación y de la fase de latencia microbiana y es recomendable que aplique modelos matemáticos que contemplan tal variabilidad.

6 BIBLIOGRAFÍA

- Adams, M.R., Moss, M.O. 1997. Microbiología de los alimentos. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España), págs. 67-73.
- Adams, M.R., Nicolaidis, L. 1997. Review of the sensitivity of different food borne pathogens to fermentation. Food Control, Volume 8, Number 5, October, pp. 227-239 (13).
- Adams, M.R., and Moss, M.O. 2008. Food Microbiology Third Edition. University of Surrey, Guildford, UK. Publishing Royal Society of Chemistry.
- Agencia Española de Seguridad Alimentaria y Nutrición (AESAN). 2011. Informe del Comité Científico en relación a los estudios de vida útil para *Listeria monocytogenes* en determinados productos alimenticios. Número de referencia: AESAN-2011-003.
- Aguilar, J. 2012. Métodos de conservación de alimentos. ISBN: 978-607-733-150-6. Editorial: Red Tercer Milenio. Primera Edición. Pág. 29-90.
- Aguirre J.S., Pin, C., Rodriguez, M.R., and García de Fernando GD, 2009a. Analysis of the variability in the number of viable bacteria after mild heat treatment of food. Applied and Environmental Microbiology, 75 (22): 6992-6997.
- Aguirre, J.S., Rodriguez, M.R., y García de Fernando, GD. 2009b. Variability analysis of microbial inactivation by different preserving treatments. BioMicroWorld, Lisboa, 2-4 December, p. 363.
- Aguirre, J.S., Rodriguez, M.R., Locatelli, M., y García de Fernando, G. 2009c. Variability analysis of microbial inactivation after heat treatments and the survivor lag phase. 6th International Conference on Predictive Modelling in Foods, Washington, 8-12 September.
- Aguirre, J.S., Rodriguez, M.R., Locatelli, M., y García de Fernando, G.D. 2009d. Modelo probabilístico de supervivencia y crecimiento de *Listeria innocua*. XXII Congreso Nacional SEM. Almería 21-24 de Septiembre.
- Aguirre, J.S., Rodriguez, M.R., and García de Fernando, G.D. 2011. Effects of electron beam irradiation on the variability in survivor number and duration of lag phase of four food-borne organisms. International Journal of Food Microbiology. 149 (3): 236-246.
- Aguirre, J., Bravo, C., Ordóñez, J.A., García de Fernando, G. 2012. The Poisson distribution is applied to improve the estimation of individual cell and micropopulation lag phases. Advances in Microbiology, Vol. 2 No. 2, 146-161.
- Aguirre, J.S. 2012. Variabilidad de la Inactivación microbiana y de la fase de latencia de los microorganismos supervivientes a diferentes tratamientos conservantes de alimentos. Memoria presentada para optar al grado de doctor por la Universidad Complutense de Madrid (España). Facultad de Veterinaria. Departamento Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos.
- Aguirre, J., Gonzáles, A., Özçelik, N., Rodriguez, M.R., García de Fernando, G.D. 2013a. Modelling the *Listeria innocua* micropopulation lag phase and its variability. International Journal of Food Microbiology. Jun 3; 164 (1): 60-9.
- Aguirre, J., Rodriguez, M.R., Gonzales, R., and García de Fernando, G. 2013b. E-beam irradiation affects the maximum specific growth rate of *Bacillus cereus*. International Journal of Food Science & Technology. Volume 48, Issue 2, pages 382-386.
- Aguirre, J.S., Monis, A., and García de Fernando, G.D. 2013. Improvement in the lag phase estimation of individual cells that have survived mild heat treatment. International Journal of Food Science & Technology. 49 (3): 884-894.
- Ahamad, N., and Marth, E.H. 1989. Behaviour of *Listeria monocytogenes* at 7, 13, 21 and 35°C in tryptose broth acidified with acetic, citric or lactic acid. Journal of Food Protection. 52: 688-695.

- Alakomi, H.L., Skyttä, E., Saarela, M., Mattila-Sandholm, T., Latva-Kala, K. and Helander, I.M. 2000. Lactic acid permeabilizes gram-negative bacteria by disrupting the outer membrane. *Applied and Environmental Microbiology*. May; 66 (5): 200-5.
- Álvarez, A. 2009. "Estudio de los factores que determinan la respuesta de adaptación ácida y de protección cruzada frente al calor de *Salmonella* Typhimurium y *Salmonella* Senftenberg: mecanismos implicados". Memoria presentada para optar al grado de doctor por la Universidad de León (España). Departamento de Higiene y Tecnología de los Alimentos.
- Álvarez-Ordóñez, A, Fernández A., Bernardo, A., López, M. 2009. Comparison of acids on the induction of an acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*, consequences for food safety. *Meat Science*. 81 (1): 65-70.
- Anderson, M., y Calderón, V. 2000. Microbiología alimentaria. Metodología analítica para alimentos y bebidas. 2ª Edición. Edita Días de Santos, S. A. Madrid, España, págs. 125-138.
- Arvizu-Medrano, S.M., Escartín, E.F. 2005. Effect of acid shock with hydrochloric, citric, and lactic acids on the survival and growth of *Salmonella typhi* and *Salmonella typhimurium* in acidified media. *Journal of Food Protection*. Oct; 68 (10): 2047-53.
- Augustin, J.C., Carlier, V. 2000. Mathematical modelling of the growth rate and lag time for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 56: 29-51.
- Augustin, J. C., Brouillaud-Delattre, A., Rosso, L., Carlier, V. 2000a. Significance of inoculum size in the lag time of *Listeria monocytogenes*. *Applied Environmental Microbiology*. Apr; 66 (4): 1706-10.
- Augustin, J. C., Rosso, L. Carlier, V. 2000b. A model describing the effect of temperature history on lag time for *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 57 (3): 169-81.
- Axe, D.D., and Bailey, J.E. 1995. Transport of lactate and acetate through the energized cytoplasmic membrane of *Escherichia coli*. *Biotechnology Bioengineering*. Jul 5; 47 (1): 8-19.
- Bacon, R.T., Sofos, J.N., Kendall, P.A., Belk, K.E., and Smith, G.C. 2003a. Comparative Analysis of Acid Resistance between Susceptible and Multi-Antimicrobial-Resistant *Salmonella* Strain Cultured under Stationary-Phase Acid Tolerance-Inducing and Noninducing Conditions. *Journal of Food Protection*. Number 5, May 2003, pp 732-740 (9).
- Bajaj, V.K., Rai, T., Kanawjia, S.K. 1991. Biotechnological applications for analysis of food and food additives. *Indian Dairyman*. 43: 505-513.
- Baranyi, J., Roberts, T.A. 1994. A dynamic approach to predicting bacterial growth in food. *International Journal of Food Microbiology*. Nov; 23 (3-4): 277-94.
- Baranyi, J., Robinson, T.P., Kaloti, A., Mackey, B.M. 1995. Predicting growth of *Brochothrix thermosphacta* at changing temperature. *International Journal of Food Microbiology*. Sep; 27 (1): 61-75.
- Baranyi, J. and Roberts, T.A. 1995. Mathematics of predictive food microbiology. *International Journal of Food Microbiology*. Volumen 26 (2): 199-218.
- Baranyi, J., Pin, C., and Ross, T. 1999a. Validating and comparing predictive models. *International Journal of Food Microbiology*. 48 (3): 159-166.
- Baranyi, J., Pin, C. 1999. Estimating growth parameters by means of detection times. *Applied and Environmental Microbiology*. Feb; 65 (2): 732-736.
- Baranyi, J. 2002. Stochastic modelling of bacterial lag phase. *International Journal of Food Microbiology*. 73: 203-206.

- Baumgart, J. 1992. Rapid detection of microorganisms in factory laborories (*Schnellnachweis von Mikroorganismen im Betrieslabor*). Mitteilungen aus dem Gebiete der Lebensmitteluntersuchung und Hygiene. 82: 579-588.
- Bazin, M.J., and Prosser, J.I. 1992. Modelling microbial ecosystems. Journal of Applied Bacteriology. December, Volume 73, Issue Supplement s21, pages 89s-95s.
- Bearson, S., Bearson, B., Foster, J.W. 1997. Acid stress responses in enterobacteria. FEMS Microbiology Letters. Feb 15; 147 (2): 173-80.
- Begot, C., Desnier, I., Daudin, J.D., Labadie, J.C., Lebert, A. 1996. Recommendations for calculating growth parameters by optical density measurements. Journal of Microbiology Methods. 25: 225-232.
- Begot, C., Lebert, I., and Lebert, A. 1997. Variability of the response of 66 *Listeria monocytogenes* and *Listeria innocua* strains to different growth conditions. Food Microbiology. 14: 403-412.
- Berk, P.A., Jonge, R., Zwietering, M.H., Abee, T., Kieboom, J. 2005. Acid resistance variability among isolates of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104. Journal of Applied Microbiology. 99 (4): 859-66.
- Bodmer, T., Miltner, E., Bermúdez, L.E. 2000. *Mycobacterium avium* resists exposure to the acidic conditions of the stomach. FEMS Microbiology Letters. Jan 1; 182 (1): 45-49.
- Booth, I.R. 2002. Stress and the single cell: intrapopulation diversity is a mechanism to ensure survival upon exposure to stress. International Journal of Food Microbiology. 78 (1-2): 19-30.
- Bratchell, N., Gibson, A.M., Truman, M., Kelly, T.M., Roberts, T.A. 1989. Predicting microbial growth: the consequences of quantity of data. International Journal of Food Microbiology. Feb; 8(1): 47-58.
- Bréand, S., Fardel, G., Flandrois, J.P., Rosso, L., Tomassone, R. 1997. A model describing the relationship between lag time and mild temperature increase duration. International Journal of Food Microbiology. Sep 16; 38 (2-3): 157-67.
- Brocklehursts, T.F., Wilson, P.D.G. 2000. The role of lipids in controlling microbial growth. Grasas y Aceites. Vol.51. Fasc. 1-2, 66-73. Institute of Food Research Norwich Research Park Colney. Norwich NR5 7UA, UK.
- Brown, M.H., and Booth, I.R. 1991. Acidulants and low pH. In: Russel, N.J. and Gould, G.W. (Eds). Food Preservatives. Blackie. Glasgow, U.K., p. 22-43.
- Brown, J.L., Ross, T., McMeekin, T.A., and Nichols, P.D. 1997. Acid habituation of *Escherichia coli* and the potential role of cyclopropane fatty acids in low pH tolerance. International Journal of Food Microbiology. 37: 163-173.
- Buchanan, R.L., & Solberg, M. 1972. Interaction of sodium nitrite, oxygen and pH on growth of *Staphylococcus aureus*. Journal of Food Science, 37, 81-85.
- Buchanan, R.L., Cygnarowicz, M.L. 1990. A mathematical approach toward defining and calculating the duration of the lag phase. Food Microbiology. 7: 237-240.
- Buchanan, R.L., and Phillips, J.G. 1990. Response surface model for predicting the effects of temperature, pH, sodium chloride content, sodium nitrite concentration and atmosphere on the growth of *Listeria monocytogenes*. Journal of Food Protection. 53: 370-376.
- Buchanan, R.L., Klawitter, L.A. 1991. Effect of temperature history on the growth of *Listeria monocytogenes* Scott A at refrigeration temperatures. International Journal of Food Microbiology. Feb; 12 (2-3): 235-245.

- Buchanan, R.L., Golden, M.H., and Whiting, R.C. 1993a. Differentiation of the effects of pH and lactic and acetic acid concentration on the kinetics of *Listeria monocytogenes* inactivation. *Journal of Food Protection*. 56: 474-478
- Buchanan, R.L., Smith, J.L., McColgan, C., Marner, B.S., Golden, M.H., and Dell, B. 1993. Response surface models for the effects of temperature, pH, sodium chloride and sodium nitrite on the aerobic and anaerobic growth of *Staphylococcus aureus*. 196E. *Journal of Food Safety*. 13: 159-175.
- Buchanan, R.L. 1993. Predictive food microbiology. *Trends in Food Science & Technology*. 4: 4-11.
- Buchanan, R.L., and Whiting, R.C. 1996. Risk assessment and predictive microbiology. *Journal of Food Protection*, 59 (Supplement), 31-6.
- Buchanan, R.L., Whiting, R.C., and Damert, W.C. 1997a. When is simple good enough: a comparison of the Gompertz, Baranyi and three-phase linear models for fitting bacterial growth curves. *Food microbiology*. 14: 313-326.
- Buchanan, R. L., Golden, M.H., and Philips, J.G. 1997b. Expanded models for the non-thermal inactivation of *Listeria monocytogenes*. *Journal of Applied Microbiology*. Volume 82, Issue 5, pages 567-577.
- Buchanan, R.L., and Edelson, S.G. 1999. Effect of pH-dependent stationary- phase acid resistance response of enterohemorrhagic *Escherichia coli* in the presence of various acidulants. *Journal of Food Protection* 62, 211-218.
- Brul, S., and Coote, P. 1999. Preservative agents in foods. Mode of action and microbial resistance mechanisms. *International Journal of Food Microbiology*. Sep 15; 50 (1-2): 1-17.
- Cabeza, M^a. C., Ordóñez, J.A., Manzano, S., Escudero, R., Romero de Ávila, M^a. D., Velazco, R., García-Márquez, I. y Cambero, M.I. 2012. Pasteurización de tortilla española mediante ionización electrónica. *Avances en microbiología de los alimentos*. Elena Gonzáles Fandos (ed.). Editores Universidad de la Rioja. Recoge los contenidos presentados a: Congreso Nacional de Microbiología de Alimentos. Logroño (España). Pág. 190-192.
- Calderón-Miranda, M.L., Gonzáles San Martín, M.F., Barbosa-Cánovas, G.V., Swanson, B.G. 1999. Métodos no térmicos para procesamiento de alimentos: Variables e inactivación microbiana. *Brazilian Journal Food Technology*, Campinas, 1 (1-2): 3-11.
- Carrasco Jiménez, E. 2007. Análisis del riesgo microbiológico “*Listeria monocytogenes*” en ensaladas de IV gama. Memoria presentada para optar al grado de doctor por la Universidad de Córdoba (España). Departamento Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Pág. 229-30.
- Casp, A. y Requena, J.A. 2003. Procesos de conservación de alimentos. Segunda Edición. A. Madrid Vicente, Ediciones Mundi-Prensa.
- Castaine-Cornet, M.P., Penfound, T.A., Smith, D., Elliott, J.F., Foster, J.W. 1999. Control of acid resistance in *Escherichia coli*. *Journal of Bacteriology*. Jun; 181 (11): 3525-35.
- Castaine-Cornet, M.P., Foster, J.W. 2001. *Escherichia coli* acid resistance: cAMP receptor protein and a 20 bp cis-acting sequence control pH and stationary phase expression of the gadA and gadBC glutamate decarboxylase genes. *Microbiology*. Mar; 147 (Pt 3): 709-15.
- Cheng, C.M., and Kaspar C.W. 1998. Growth and processing conditions affecting acid tolerance in *Escherichia coli* O157:H7. *Food Microbiology*. 15:157-166.
- Cherouttre-Vialette, M., Lebert, I., Hebraud, M., Labadie, J.C., and Lebert, A. 1998. Effects of pH or a(w) stress on growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. Jun 30; 42 (1-2): 71-7.

- Cherrington, C.A., Hinton, M., Mead, G.C., and Chopra, I. 1991. Organic acids: chemistry, antibacterial activity and practical applications. *Advances in Microbial Physiology* 32: 87-108.
- Chipley, J.R. 1993. Sodium benzoate and benzoic acid. In *Antimicrobials in Foods*, Branen, A. L. and Davidson, P.M., Eds., Marcel Dekker, New York, p. 11-48.
- Chorin, E., Thuault, D., Cléret, J.J., Bourgeois, C.M. 1997. Modelling *Bacillus cereus* growth. *International Journal of Food Microbiology*. Sep 16; 38 (2-3): 229-34.
- Chung, H.J., Bang, W., and Drake, M.A. 2006. Stress response of *Escherichia coli*. *Comprehensive Reviews in Food Science and Food Safety*. 5 (3): 52-64
- Comisión del Codex Alimentarius. 2012. Programa conjunto FAO/OMS sobre normas alimentarias. 35º período de sesiones Roma, Italia 2-7 de Julio.
- Conner, D.E., Kotrola, J.S. 1995. Growth and survival of *Escherichia coli* O157:H7 under acidic conditions. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (1): 382-5.
- Cossins, A.R., Sinensky, M. 1984. Adaption of membranes to temperature, pressure and exogenous lipids. In: Shinitzky M (ed) *Physiology of membrane fluidity*, vol II. CRC Press, Boca Raton, Florida, p. 1-20
- Cubero, N., Monferrer, A. y Villalta, J., 2002. *Aditivos Alimentarios*. Coedición A. Madrid Vicente. Ediciones Mundi-Prensa.
- D'Aoust, J.Y. 2000. Especies de *Salmonella*. In: Doyle, M. P.; Beuchat, L.R.; and Montville, T. J. (2000). *Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y Fronteras*. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España). 133-163.
- D'Aoust, J.Y. 2001. *Salmonella*. In R.G. Labbe and S. García, (ed.). *Guide to Food-borne Pathogens*. John Wiley and Sons Inc., New York. p. 163-191.
- D'Arrigo, M., García de Fernando, G.D., Velasco de Diego, R., Ordóñez, J.A., George, S.M., Pin, C. 2006. Indirect measurement of the lag time distribution of single cells of *Listeria innocua* in food. *Applied and Environmental Microbiology*. 72 (4): 2533-8.
- Dalgaard, P., Ross, T., Kamperman, L., Neumeyer, K., McMeekin, T.A. 1994. Estimation of bacterial growth rates from turbidimetric and viable count data. *International Journal of Food Microbiology*. Nov; 23 (3-4): 391-404.
- Dalgaard, P., & Jorgensen, L.V. 1998. Predicted and observed growth of *Listeria monocytogenes* in seafood challenge tests and in naturally contaminated cold smoked salmon. *International Journal of Food Microbiology*. 40 (1-2): 105-115.
- Davey, K.R. 1989. A predictive model for combined temperature and water activity on microbial growth during the growth phase. *Journal of Applied Bacteriology*. Nov; 67 (5): 483-8.
- Davey, K.R. 1991. Applicability of the Davey (linear Arrhenius) predictive model to the lag phase of microbial growth. *Journal of Applied Bacteriology*. March, Volume 70, Issue 3, pages 253-257.
- Davey, K.R. 1994. Modelling the combined effect of temperature and pH on the rate coefficient for bacterial growth. *International Journal of Food Microbiology*. Nov; 23 (3-4): 295-303.
- Davidson, P.M. 1997. Chemical preservatives and natural antimicrobial compounds. In *Food Microbiology: Fundamentals and Frontiers*. Doyle, M.P., Beuchat, L.R., and Montville, T.J. (ed.). American Society for Microbiology, Washington DC. p. 520-556.
- Davidson, P.M., and Harrison, M.A. 2002. Resistance and adaptation to food antimicrobials, sanitizers and other process controls. *Food Technology*. 56 (11): p. 69-78. (Institute of Food Technologists Status Summary).

- Delignette-Muller, M.L. 1998. Relation between the generation time and the lag time of bacterial growth kinetics. *International Journal of Food Microbiology*. Aug 18; 43 (1-2): 97- 104.
- Delignette-Muller, M.L., Rosso, L. 2000. Biological variability and exposure assessment. *International Journal of Food Microbiology*. 58 (3): 203-12.
- de Jonge, R., Ritmeester, W.S., and van Leusden, F.M. 2003. Adaptive responses of *Salmonella enterica* serovar Typhimurium DT104 and other *S. Typhimurium* strains and *Escherichia coli* O157 to low pH environments. *Journal of Applied Microbiology*. 94 (4): 625-32.
- Del Rio, E., Panizo-Morán, M., Prieto, M., Alonso-Calleja, C., Capita, R. 2007. Effect of various chemicals decontamination treatments on natural microflora and sensory characteristics of poultry. *International Journal of Food Microbiology*. 115 (3): 268-280.
- Denyer, S.P. & Stewart, G.S.A.B. 1998. Mechanisms of action of disinfectants. *International Biodeterioration & Biodegradation*. 41, 261- 268.
- Devlieghere, F., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., De Meulenaer, B., Samapundo, S. 2005. Predictive modelling of the individual and combined effect of water activity and temperature on the radial growth of *Fusarium verticillioides* and *F. proliferatum* on corn. *International Journal of Food Microbiology*. 105 (1): 35-52.
- De Vuyst, L., Foulquié Moreno, M.R., and Revets, H. 2003. Screening for enterocins and detection of hemolysin and vancomycin resistance in enterococci of different origins. *International Journal of Food Microbiology*. 84, 299-318.
- Díaz, C. 2011. Adherencia y colonización de *Pseudomonas fluorescens* sobre sustratos sólidos: Influencia de la topografía y composición química de la superficie. Memoria presentada para optar al grado de doctor. Universidad Nacional de la Plata. Facultad de Ciencias Exactas. Departamento de química.
- Dickson, J.S. 1991. Contamination of beef tissue surfaces by artificially inoculated low-moisture menstua. *Journal of Food Safety*. Volume 12, Issue 3, pages: 181-190.
- Directiva 1999/3/CE del Parlamento Europeo y del Consejo de 22 de Febrero de 1999, por la que se establece la lista de alimentos e ingredientes alimenticios a los que se puede tratar con radiaciones ionizantes en la Comunidad Europea. Diario Oficial L, 13.3.1999., ed. C. Parlamento Europeo. 1999. Pág. 24-25.
- Dorsa, W.J., Cutter, C.N., and Siragusa, G.R. 1998. Long-term bacterial profile of refrigerated ground beef made from carcass tissue, experimentally contaminated with pathogens and spoilage bacterial after hot water, alkaline, or organic acid washes. *Journal of Food Protection*. Vol. 61. No 12: 1615-1622.
- dos Santos, A. J. 2007. Estudio del Comportamiento Cinético de Microorganismos de Interés en Seguridad Alimentaria con Modelos Matemáticos. Memoria presentada para optar al grado de doctor por la Universidad Autónoma de Barcelona. Facultad de Veterinaria. Departamento de Ciencia Animal y de los Alimentos. Área de Nutrición y Bromatología.
- Doyle, M.P., Beuchat, L.R., and Montville, T.J. Editores. 2001. Microbiología de los alimentos. Fundamentos y Fronteras. Editorial Acribia S.A. Zaragoza (España), págs. 3-10.
- Duffy, G., Riordan, D.C., Sheridan, J.J., Call, J.E., Whiting, R.C., Blair, I.S., McDowell, D.A. 2000. Effect of pH on survival, thermotolerance and verotoxin production of *Escherichia coli* O157:H7 during simulated fermentation and storage. *Journal of Food Protection*. Jan; 63 (1): 12-18.
- Dufrenne, J., Defgou, E., Ritmeester, W., Notermans, S. 1997. The effect of previous growth conditions on the lag time of some foodborne pathogenic micro-organisms. *International Journal of Food Microbiology*. 34 (1): 89-94.

- Dunkley, E.A. Jr., Guffanti, A.A., Clejan, S., Krulwich, T.A. 1991. Facultative alkaliphiles lack fatty acid desaturase activity and lose the ability to grow at near-neutral pH when supplemented with an unsaturated fatty acid. *Journal of Bacteriology*. 173 (3): 1331-4.
- Eifert, Joseph D., Gennings, Chris., Carter, W. Hans., Duncan, Susan E., Hackney, Cameron R. 1996. Predictive Model with Improved Statistical Analysis of interactive factors affecting the growth of *Staphylococcus aureus* 196E. *Journal of Food Protection*. Number 6, June, pp. 570-673.
- Elfwing, A., LeMarc, Y., Baranyi, J., Ballagi, A. 2004. Observing growth and division of large numbers of individual bacteria by image analysis. *Applied and Environmental Microbiology*. 70 (2): 675-8.
- Esty, J.R., and Meyer, K.F. 1922. The heat resistance of the spores of *B. botulinum* and allied anaerobes. XI', *Journal of Infectious Diseases*. 31: 650-663.
- European Food Safety Authority Journal (EFSA). 2013. The European Union Summary Report on Trends and Sources of Zoonosis, Zoonotic Agents and Food-borne Outbreaks in 2011. *EFSA Journal* 2013; 11(4): 3129.
- FAO/WHO. 2004. Risk assessment of *Listeria monocytogenes* in ready-to-eat foods. Technical Report. Microbial Risk Assessment Series 5.
- Fellows, P.J. 2009. Food processing technology. Principles and practice. Third edition. Boca Raton. Boston. New York. Washington D.C. p. 413-416.
- Fernández, P.S., George, S.M., Sills, C.C., Peck, M.W. 1997. Predictive model of the effect of CO₂, pH, temperature and NaCl on the growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. Jun 17; 37 (1): 37-45.
- Fernández, A. 2007. Estudio de la adaptación a la acidez como fenómeno capaz de inducir respuestas de tolerancia ácida y protección cruzada frente al calor y los pulsos eléctricos de alto voltaje en *Enterococcus faecium*. Memoria presentada para optar al grado de doctor por la Universidad de León (España).
- Fernández, A., Álvarez-Ordóñez, A., López, M., and Bernardo, A. 2009. Effects of organic acids on thermal inactivation of acid and cold stressed *Enterococcus faecium*. *Food Microbiology*. Volume 26. P. 497-503.
- Fetherston, J.D., and Perry, R.D. 1994. The pigmentation locus of *Yersinia pestis* KIM6+ is flanked by an insertion sequence and includes the structural genes for peptising sensitivity and HMWP2. *Molecular Microbiology*. 13: 697-708.
- Food and Drug Administration (FDA). 1984. Bacteriological Analytical Manual, Bureau of Foods. Division of Microbiology. Ed., 6a Washington D.C., USA.
- Food and Drug Administration (FDA). 2000. Sodium acetate, sodium acetate, sodium lactate and potassium lactate. Use as food additives. Washington D.C. Federal Register. 65: p. 17128-17129.
- Foster, J.W., Hall, H.K. 1990. Adaptative acidification tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 172 (2): 771-8.
- Foster, J.W. 2000. Microbial responses to acid stress. In: Storz, G., Hengge-Aronis, R., editors. Bacterial stress responses. Washington, D.C: ASM Press. p. 99-115.
- Foster, J.W. 2004. *Escherichia coli* resistance: tales of an amateur acidophile. *Nature Reviews Microbiology*. Nov; 2 (11): 898-907.
- Foulquié, M.R., Sarantinopoulos, P., Tsakalidou, E., De Vuyst, L. 2006. The role and application of enterococci in food and health. *International Journal of Food Microbiology*. 106: 1-24.

- Francois, K., Devlieghere, F., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J. 2003. Modelling the individual cell lag phase. Isolating single cells: protocol development. *Letter of Applied Microbiology*. 37(1): 26-30.
- Francois, K., Devlieghere, F., Smet, K., Standaert, A.R., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F., Debevere, J. 2005a. Modelling the individual cell lag phase: effect of temperature and pH on the individual cell lag distribution of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. Apr 15; 100 (1-3): 41- 53.
- Francois, K.F., Devlieghere, A.R., Standaert, A.H., Geeraerd, I., Cools, J.F., Van Impe, J.F., and Debevere, J. 2005b. Environmental factors influence the relation between optical density and cell count for *Listeria monocytogenes*. *J. Appl. Microbiology*. 99 (6): 1503-1515.
- Franz, C.M.A.P., Stiles, M.E., Schleifer, K.H., Holzapfel, W.H. 2003. Enterococci in foods-a conundrum for food safety. *International Journal of Food Microbiology*. 88: 105-122.
- Fratamico, P. M., Bhunia, A. K., and Smith, J. L. 2005. *Foodborne Pathogens: Microbiology and Molecular Biology*, ed. C.A. Press. Norfolk, UK.
- Gahan, C.G., Hill, C. 1999. The relationship between acid stress responses and virulence in *Salmonella typhimurium* and *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. Sep 15; 50 (1): 93-100.
- García de Fernando, G.D. 2003. Aportaciones al estudio de la fase de latencia de los microorganismos relevantes en microbiología de los alimentos. Proyecto presentado para la habilitación a catedrático de tecnología de los alimentos. Departamento de Nutrición, Bromatología y Tecnología de los Alimentos. Facultad de Veterinaria. Universidad Complutense de Madrid.
- García de Fernando, G.D. 2011. Lactic Acid Bacteria *Enterococcus* in Milk and Dairy Products. En: Fuquay JW, Fox PF y McSweeney PLH (Eds.), 2ª ed., vol. 3, p. 153-159. San Diego: Academic Press. ISBN: 978-0-12-374402-9.
- García-Gimeno, R.M., Hervás-Martínez, C., de S. 2002. Improving artificial neural networks with a pruning methodology and genetic algorithms for their application in microbial growth prediction in food. *International Journal of Food Microbiology*. Jan 30; 72 (1-2): 29-30.
- García-Gimeno, R.M., Hervás-Martínez, C., Rodríguez-Pérez, R., Zurera-Cosano, G. 2005. Modelling the growth of *Leuconostoc mesenteroides* by Artificial Neuronal Networks. *International Journal of Food Microbiology*. Dec 15; 105 (3): 317-32. Epub 2005 Jul 28.
- García, R. M. 1995. Modificaciones microbiológicas, fisicoquímicas y organolépticas de vegetales envasados en atmósfera modificada. Bases para el establecimiento de los modelos predictivos del crecimiento microbiano. Memoria presentada para optar al grado de doctor por la Universidad de Córdoba (España). Facultad de Veterinaria. Departamento Bromatología y Tecnología Alimentos.
- García, R., Pérez, F., Posada, G., Carrasco, E., Valero, A., Del Rosal, S., Rodríguez, M. y Zurera, G. 2012. Aplicación Web para la predicción del riesgo microbiológico en productos vegetales y cárnicos mínimamente procesados. *Avances en microbiología de los alimentos*. Elena González Fandos (ed.). Editores Universidad de la Rioja. Recoge los contenidos presentados a: Congreso Nacional de Microbiología de Alimentos. Logroño (España). Pág. 121-123.
- García Pina, Javier. 2011. Aplicación de ácidos orgánicos como conservante en productos cárnicos. CHEMITAL TÉCNICAS ALIMENTARIAS (conservantes en productos cárnicos. CHEMITAL S.A. training. Aplicación de ácidos orgánicos como conservantes. Conservantes en productos cárnicos).
- García-Portillo, F., Foster, J.W., and Finley, B.B. 1993. Role of the Acid Tolerance Response genes in *Salmonella typhimurium* virulence. *Infection and Immunity*. 61: 4489-92.

- Garren, D.M., Harrison, M.A., Russell, S.M. 1998. Acid tolerance and acid shock response of *Escherichia coli* O157:H7 and non-O157:H7 isolates provide cross protection to sodium lactate and sodium chloride. *Journal of Food Protection*. Feb; 61 (2): 158-61.
- Geeraed, A.H., Herremans, C.H., Cenens, C., & Van Impe, J.F. 1998. Application of artificial neural networks as a non-linear modular modelling technique to describe bacterial growth in chilled food product. *International Journal of Food Microbiology*. 44 (1-2):49-68.
- Geeraed, A.H., Valdramidis, V.P., Devlieghere, F., Bernaert, H., Debevere, J., Van Impe, J.F. 2004. Development of a novel approach for secondary modelling in predictive microbiology: incorporation of microbiological knowledge in black box polynomial modelling. *International Journal of Food Microbiology*. 91 (3): 229-244.
- Giannuzzi, L., Zaritzky, N.E. 1996. Effect of Ascorbic Acid in Comparison to Citric and Lactic Acid on *Listeria monocytogenes* Inhibition at Refrigeration Temperatures. *Lebensmittel-Wissenschaft-Technology*. 29(3): 278-285.
- Gibson, A.M., Bratchell, N., Roberts, T.A. 1987. The effect of sodium chloride and temperature on the rate and extent of growth of *Clostridium botulinum* type A in pasteurized pork slurry. *Journal of Applied Bacteriology*. Jun; 62 (6): 479-90.
- Gibson, A.M., Bartchell, N., Roberts, T.A. 1988. Predicting microbial growth: growth responses of *Salmonella* in a laboratory medium affected by pH, sodium chloride and storage temperature. *International Journal of Food Microbiology*. Mar; 6 (2): 155-78.
- Gill, C.O., Harrison, J.C.L., and Philipps, D.M. 1991. Use of temperature function integration technique to assess the hygienic adequacy of a beef carcass cooling process. *Food Microbiology*. 8: 83-94.
- González Rivas, F. 2005. Desarrollo y aplicación de sensores para evaluar la contaminación microbiológica de superficies domésticas españolas y de la efectividad de desinfección in situ de productos limpiadores comerciales.
- Gould, G.W., Brown, M.H., & Fletcher, B.C. 1983. Mechanisms of action of food preservation procedures. In: Roberts, T.A. & F.A. Skinner (Eds.). *Food Microbiology, advances and prospects*. London: Academic Press (pp. 67-84).
- Gould, G.W. 1995. *New Methods of Food Preservation*. Primera Edición. Pág. 40-82.
- Ghanem, R., Red-Horse, J. 1999. Propagation of probabilistic uncertainty in complex physical systems using a stochastic finite element approach. *Journal Physical D- Special issue originating from the 18th Annual International Conference of the Center for Nonlinear Studies, Los Alamos, NM, May 11—15*. Volume 133 (1-4): 137-144.
- Glass, K.A., Loeffelholz, J.M., Ford, J.P., Doyle, M.P. 1992. Fate of *Escherichia coli* O157:H7 as affected by pH or sodium chloride and in fermented, dry sausage. *Applied and Environmental Microbiology*. 58 (8): 2513-6.
- Gnanou Besse, N., Audinet, N., Barre, L., Cauquil, A., Cornu, M., Colin, P. 2006. Effect of the inoculum size on *Listeria monocytogenes* growth in structured media. *International Journal of Food Microbiology*. Jul 1; 110 (1): 43-51.
- Greenacre, E.J., Brocklehurst, T.F., Waspe, C.R., Wilson, D.R., and Wilson, P.D.G. 2003. *Salmonella enterica* serovar Typhimurium and *Listeria monocytogenes* Acid Tolerance Response Induced by Organic Acid at 20° C: Optimization and Modelling. *Applied and Environmental Microbiology*. July 69; 7: 3945-3951.
- Greer, G.G., Dilts, B.D. 1992. Factors affecting the susceptibility of meat borne pathogens and spoilage bacteria to organic acids. *Foods Research International*. 25: 355-364.

- Gregory, S.H., Sagnimeni, A.J., and Wing, E.J. 1996. Expression of the in lab operon by *Listeria monocytogenes* is not required for entry into hepatic cells in vivo. *Infection and Immunity*. 64: 3983-3986.
- Grupo Industrial AISA, S.A. 2009. Ácido acético glacial. Aplicaciones y especificaciones. www.oocities.com/grupoindustrialaisa/acetico.html.
- Guillier, L., Pardon, P., Augustin, J.C. 2005. Influence of stress on individual lag time distributions of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 71(6): 2940-8.
- Guillier, L., & Augustin, J.C. 2006. Modelling the individual cell lag time distribution of *Listeria monocytogenes* as a function of the physiological state and the growth conditions. *International Journal of Food Microbiology*. 111: 241-51.
- Hartwing, P., and McDaniel, M.R. 1995. Flavour Characteristics of Lactic, Malic, Citric and Acetic Acids at Various pH Levels. *Journal of Food Science*. March, Volume 60, Issue 2; pages 384-388.
- Herrero, AM., y Romero de Ávila, MA. 2006. Innovaciones en el procesado de alimentos: Tecnologías no térmicas. *REV. MED. Universidad de Navarra*. Vol. 50, Nº 4. 71-74.
- Heinzel, M. 1998. Phenomena of biocide resistance in microorganisms. *International biodeterioration & biodegradation*, 1998 - Elsevier. 41: 225-234.
- Hesse, W. 1960. Über das Verhalten pathogener Mikroorganismen in pasteurisierter Milch. *Medical Microbiology and Immunology*. 34: 346-348.
- Hills, B.P., Wright, K.M. 1994. A new model for bacterial growth in heterogeneous systems. *Journal of Theoretical Biology*. May 7; 168(1): 31-41.
- Hills, B.P., Manning, CE., Ridge, Y., Brocklehursts, T. 1997. Water availability and the survival of *Salmonella typhimurium* in porous systems. *International Journal of Food Microbiology*. May 20; 36 (2-3):187-98.
- Hornbaek, T., Dynesen, J., Jakobsen, M. 2002. Use of fluorescence ratio imaging microscopy and flow cytometry for estimation of cell vitality for *Bacillus licheniformis*. *FEMS Microbiology Letter*. 215 (2): 261-5.
- Horowitz, J., Normand, M.D., Corradini, M.G., Peleg, M. 2010. Probabilistic model of microbial cell growth, division, and mortality. *Applied and Environmental Microbiology*, Jan; 76(1): 230-42.doi: 10.1128/AEM.01527-09. Epub 2009 Nov 13.
- Huang, L., Hwang, A., Phillips, J. 2011. Effect of temperature on microbial growth rate-mathematical analysis: the Arrhenius and Eyring-Polanyi connections. *Journal of Food Science*, Oct; 76 (8): E553-60. doi: 10.1111/j.1750-3841.2011.02377.x.
- Hudson, J.A., 1993. Effect of pre-incubation temperature on the lag time of *Aeromonas hydrophila*. *Letter in Applied Microbiol*. May. Volume 16, Issue 5, pages 274-276.
- Hudson, J.A., and Mott, S.J. 1994. Comparison of lag times obtained from optical density and viable count data for a strain of *Pseudomonas fragi*. *Journal of Food Safety*. December, Volume 14, Issue 4, pages 329-339.
- Humpheson, L., Adams, M.R., Anderson, W.A., Cole, M.B. 1998. Biphasic thermal inactivation kinetics in *Salmonella enteritidis* PT4. *Applied and Environmental Microbiology*. 64(2): 459-64.
- Huhtanen, C.N., Naghski, J., Custer, C.S., Russel, R.W. 1976. Growth and toxin production by *Clostridium botulinum* in moldy tomato juice. *Applied and Environmental Microbiology*. Nov; 32 (5): 711-15.
- Ingram, M., Ottoway, F.J.H., and Coppock, J.B.M. 1956. The preservative action of acid substances in food. *Chemistry and Industry*. 46: p. 1154-1163.

- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 1980. Injury and its effect on recovery, pp. 205-214. In. Microbial Ecology of Foods, vol. 1 Factors Affecting Life and Death of Microorganisms. Academic Press, Inc., New York.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 1983. Ácidos orgánicos. In. ICMSF (Ed.). Libro de Ecología Microbiana de los Alimentos Vol. 1. Factores que afectan a la supervivencia de los microorganismos en los alimentos. Editorial Acirbia, D.L. Zaragoza (España). p. 132-142.
- International Commission on Microbiological Specifications for Foods (ICMSF). 2004. Libro Microbiología de los alimentos 7 - Análisis microbiológico en la gestión de la seguridad alimentaria. Editorial Acirbia S.A. Zaragoza (España). p. 10-11.
- Iyer, R., Williams, C., and Miller, C. 2003. Arginine-Agmatine Antiporter in Extreme Acid Resistance in *Escherichia coli*. Journal of Bacteriology. Nov; 185 (22): 6556-6561.
- Janssen, M., Geeraerd, A.H., Cappuyns, A., Garcia-Gonzales, L., Schockaert, G., Van Houteghem, N. Vereecken, K.M., Debevere, J., Devlieghere, F., Van Impe, J.F. 2007. Individual and combined effects of pH and lactic acid concentration on *Listeria innocua* inactivation: development of a predictive model and assessment of experimental variability. Applied and Environmental Microbiology. 73 (5): 1601-11.
- Joseph, B., Otta, S.K., Karunasagar, I. 2001. Biofilm formation by *Salmonella* spp. on food contact surfaces and their sensitivity to sanitizers. International Journal of Food Microbiology, 64 pp: 367-372.
- Kelly, C.D., Rahn, O. 1932. The growth rate of individual bacterial cells. Journal of Bacteriology. 23 (2): p. 147-53.
- Kennedy, S. 2008. Epidemiology: ¿Why can't we test our way to absolute food safety? Science. 322 (5908): 1641-3.
- Keskinen, L.A., Todd, E.C.D., Ryser, E. 2008. Transfer of Surface Dried *Listeria monocytogenes* from Stainless Steel Knife Blades to Roast Turkey Breast. Journal of Food Protection. 71, pp. 176-181.
- Kieboom, J., and Abee, T. 2006. Arginine-Dependent Acid Resistance in *Salmonella enterica* serovar Typhimurium. Journal of Bacteriology. Aug; 188 (15): 5650-5653.
- Kolter, R., Siegele, D.A., Torno, A. 1993. The stationary phase of the bacterial life cycle. Annual Review of Microbiology. 47: 855-74.
- Koohmaraie, M. Arthur, T.M., Basilevac, J.M., Guerini, M., Shackelford, S.D. and Wheeler, T.L. 2005. Post-harvest interventions to reduce/eliminate pathogens in beef. Meat Science. Sept; 71 (1): 79-91.
- Koutsoumanis, K.P., Kendall, P.A., and Sofos, J.N. 2003. Effect of food processing-related stresses on acid tolerance of *Listeria monocytogenes*. Applied and Environmental Microbiology. Dec; 69 (12): 7514-6.
- Koutsoumanis, K.P., Sofos, J.N. 2004. Comparative acid stress response of *Listeria monocytogenes*, *Escherichia coli* O157:H7 and *Salmonella* Typhimurium after habituation at different pH conditions. Letters in Applied Microbiology. 38 (4): 321-6.
- Koutsoumanis, K. 2008. A study on the variability in the growth limits of individual cells and its effect on the behaviour of microbial populations. International Journal of Food Microbiology. 128 (1): 116-21.
- Krisch, J., and Szajáni, B. 1997. Ethanol and acetic acid tolerance in free and immobilized cells of *Saccharomyces cerevisiae* and *Acetobacter acetic*. Biotechnology Letters, Vol 19, Nº 6, June. pp. 525-528.

- Krist, K.A., Ross, T., McMeekin, T.A. 1998. Final optical density and growth rate; effects of temperature and NaCl differ from acidity. *International Journal of Food Microbiology*. Sep 8; 43 (3): 195-203.
- Kroll, R.G., and Patchett, R.A. 1992. Induced acid tolerance in *Listeria monocytogenes*. *Letters in Applied Microbiology*. 14 (5): 224-227.
- Lee, I.S., Slonczewski, J.L., and Foster, J.W. 1994. A low-pH-inducible, stationary-phase acid tolerance response in *Salmonella typhimurium*. *Journal of Bacteriology*. 176 (5): 1422-1426.
- Lederberg, J. 1997. Infectious disease as an evolutionary paradigm. *Emerging Infectious Diseases*. 3 (4): 417- 23.
- Leyer, G. J., Johnson, E.A. 1992. Acid adaptation promotes survival of *Salmonella* spp. in cheese. *Applied and Environmental Microbiology*. Jun; 58 (6): 2075-80.
- Leyer, G.J., Wang, L.L., Johnson, E.A. 1995. Acid adaptation of *Escherichia coli* O157:H7 increases survival in acidic foods. *Applied and Environmental Microbiology*. 61 (10): 3752-5.
- Lianou, A., Stopforth, J.D., Yoon, Y., Wiedmann, M., Sofos, J.N. 2006. Growth and stress resistance variation in culture broth among *Listeria monocytogenes* strains of various serotypes and origins. *Journal of Food Protection*. 69(11): p. 2640-7.
- Lindsay, R.C. 2000. Aditivos alimentarios. In: Fennema, O.R. (Ed.). *Química de los alimentos*, 2ª edición. Acribia. Zaragoza, España. pág. 907-974.
- List of prokaryotic names with standing in nomenclature (LPSN bacterio.net) (www.bacterio.net/allnamesac.html).
- Lund, B.M. 1992. Ecosystems in vegetables foods. *Society for Applied Bacteriology Symposium. Series Journal*. 21: 115S-26S.
- Lund, B.M., Eklund, T. 2000. Control of pH and use of organic acids, in: Lund, B.M., Baird-Parker, A.C., Gould, G.W. *The microbiological safety and quality of food*, Gaithersburg (Md), Aspen, Vol. I, 175-199.
- Mackey, B.M. 2000. Injured bacteria. In: Lund, B.M., Baird-Parker, T.C., Gould, G.W., (Eds). *The Microbiological safety and quality of foods*. Aspen Publishers, Gaithersburg, MD, pp. 315-341.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., Parker, J. 1997. *Brock Biology of the Microorganisms*. Eighth edition, Prentice Hall, Upper Saddle River, NJ, USA. QR41.B718.1997, p. 149-177.
- Madigan, M.T., Martinko, J.M., and Parker, J. 1999. *Brock Biología de los Microorganismos*. Ed. Prentice Hall Iberia. 8ª Ed. Revisada, Inc. p. 149-177.
- Malakar, P.K., Barker, G.C., Zwietering, M.H., and Van't Riet, K. 2003. Relevance of microbial interactions to predictive microbiology. *International Journal of Food Microbiology*. 84 (3): 263-272.
- Manolopoulou, E., Sarantinopoulos, P., Zoidou, E., Aktypis, A., Moschopoulou, E., Kandarakis, I.G., Anifantakis, E.M. 2003. Evolution of microbial populations during traditional Feta cheese manufacture and ripening. *International Journal of Food Microbiology*. 82: p. 153-161
- Martínez Rodríguez, E. 2005. Errores frecuentes en la interpretación del coeficiente de determinación lineal. *Real Centro Universitario Escorial-María Cristina*. San Lorenzo del Escorial. *Anuario Jurídico y Económico Escurialense*, XXXVIII (2005) 315-332/ISSN: 1133-3677.
- Martínez Toral, I. 2012. Seguridad alimentaria una responsabilidad compartida. 1er Congreso Internacional en Seguridad Alimentaria. Libro de resúmenes ACOFESAL. 107- 110.

- Mazzotta, A.S. 2001. Thermal inactivation of stationary-phase and acid adapted *Escherichia coli* O157:H7, *Salmonella*, and *Listeria monocytogenes* in fruit juices. *Journal of Food Protection*. Mar; 64 (3): 315-20.
- McClure, P.J., Baranyi, J., Boogard, E., Kelly, T.M., Roberts, T.A. 1993a. A predictive model for the combined effect of pH, sodium chloride and storage temperature on the growth of *Brochothrix thermosphacta*. *International Journal of Food Microbiology*. Aug; 19 (3): 161-78.
- McClure, P.J., Cole, B.M., Davies, K.W., Anderson, W.A. 1993b. The use of automated turbidimetric data for the construction of kinetic models. *Journal of Industrial Microbiology* 12, 277-285.
- McClure, P.J., Cole, M.B., Davies, K.W. 1994. An example of the stages in the development of a predictive mathematical model for microbial growth: the effects of NaCl, pH and temperature on the growth of *Aeromonas hydrophila*. *International Journal of Food Microbiology*. Nov; 23 (3-4): 359-375.
- McClure, P.J., Beaumont, A.L., Sutherland, J.P., Roberts, T.A. 1997. Predictive modelling of growth of *Listeria monocytogenes*. The effects on growth of NaCl, pH, storage temperature and NaNO₂. *International Journal of Food Microbiology*. Mar 3; 34 (3): 221-32.
- McDonald, K., Sun, D.W. 1999. Predictive food microbiology for the meat industry: a review. *International Journal of Food Microbiology*. Nov 1; 52 (1-2): 1-27.
- McKellar, R.C. 1997. Heterogeneous population model for the analysis of bacterial growth kinetics. *International Journal of Food Microbiology* May 20; 36 (2-3): 179-86.
- McKellar, R.C. 2001. Development of a dynamic continuous-discrete-continuous model describing the lag phase of individual bacterial cells. *Journal Applied Microbiology*. Mar; 90 (3): 407-13.
- McKellar, R.C., Knight, K. 2000. A combined discrete-continuous model describing the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. Mar; 25; 54 (3): 171-80.
- McKellar, R.C., Lu, X. 2003. Modelling microbial responses in foods. *CRC Series in Contemporary Food Science*.
- McKellar, R.C., Hawke, A. 2006. Assessment of distributions for fitting lag times of individual cells in bacterial populations. *International Journal of Food Microbiology*. Feb 1; 106 (2): 169-75.
- McMeekin, T.A., Olley, J., Ross, T., Ratkowsky, D. 1993. Predictive microbiology: theory and applications. Research Studies Press, Tauton.
- McMeekin, T.A., Brown, J., Krist, K., Miles, D., Neumeyer, K., Nichols, D.S., Olley, J., Presser, K., Ratkowsky, D.A., Ross, T., Saler, M., and Soontranon, S. 1997. Quantitative microbiology: a basis for food safety. *Emerging Infectious Diseases*. 3 (4): 541-549.
- McMeekin, T.A., Olley, J., Ratkowsky, D.A., and Ross, T. 2002. Predictive microbiology: towards the interface and beyond. *International Journal of Food Microbiology*. 73: 395-407.
- McMeekin, T.A., Ross, T. 2002. Predictive microbiology: providing a knowledge-based framework for change management. *International Journal of Food Microbiology* 78: 133-153.
- Mellefont, L.A., Ross, T., McMeekin, T.A., Neumeyer, K. 2000. Induction and manipulation of bacterial lag times. *Conference Proceedings*. 12-15 September, Leuven, Belgium, pp. 70-72. ISBN 90-804818-3-1.
- Métris, A., George, S., Baranyi, J., Peck, M.W., Baranyi, J. 2003. Distribution of turbidity detection times produced by single cell-generated bacterial populations. *Journal Microbiological Methods*. Dec; 55 (3): 821-7.

- Métris, A. 2003. Modelling single cell kinetics, oral presentation, USDA-ERRC, Philadelphia, USA, 24 September 2004.
- Métris, A., Le Marck, Y., Elfwing, A., Ballagi, A., Baranyi, J. 2004. Modelling the variability of lag times and the first generation times of single cells of *E. coli*. Int. Journal of Food Microbiology. Apr 15; 100 (1-3): 13-9.
- Métris, A., Le Marc, Y., Elfwing, A., Ballagi, A., Baranyi, J. 2005 Modelling the variability of lag times and the first generation times of single cells of *E. coli*. International Journal of Food Microbiology. 100 (1-3): 13-9.
- Métris, A., George, S.M., Baranyi, J. 2006. Use of optical density detection times to assess the effect of acetic acid on single-cell kinetics. Applied and Environmental Microbiology. 72 (10): 6674-9.
- Métris, A., George, S.M., Mackey, B.M., Baranyi, J. 2008. Modelling the variability of single-cell lag times for *Listeria innocua* populations after sublethal and lethal heat treatments. Applied and Environmental Microbiology. 74(22): p. 6949-55.
- Meynell, G.G., and Meynell, E. 1970. Theory and practice in experimental bacteriology: by G.G., Meynell and Elinor Meynell. Cambridge, England: University Press.1-19.
- Mingo, E., Espallat, M., Carrascosa, A. y Martínez, A. J. 2012. Compuestos fenólicos de la uva potencialmente útiles en el control de cepas de *Campylobacter* resistentes a antibióticos. Avances en microbiología de los alimentos. Elena Gonzáles Fandos (coord.). Editores Universidad de la Rioja. Recoge los contenidos presentados a: Congreso Nacional de Microbiología de los Alimentos. Logroño (España). Pág. 123-124.
- Miranda, A. 2003. El método de remuestreo y su aplicación en la investigación biomédica. Trabajo para optar por el título de especialista de 1^{er} grado en Bioestadística. Escuela Nacional de Salud Pública Carlos J. Finlay. Ciudad de La Habana, Cuba.
- Monod, J. 1949. The growth of bacterial cultures. Annual Review Microbiology. Vol. 3: 371-394.
- Montville, T.J. 1982. Metabiotic effect of *Bacillus licheniformis* on *Clostridium botulinum*: implications for home-canned tomatoes. Applied and Environmental Microbiology. Aug; 44 (2): 334-8.
- Montville, T.J. 2000. Principios que influyen en el crecimiento, la supervivencia y la muerte microbiana en los alimentos. In: Doyle, M.P.; Beuchat, L.R.; y Montville, T.J. 2000. Microbiología de los Alimentos. Fundamentos y Fronteras. Editorial Acribia, S.A. Zaragoza (España). 13-30.
- Montville, T.J. and Matthews, K.R. 2009. Microbiología de los alimentos. Introducción, 2^a ed. Editorial Acribia S.A. Zaragoza (España): págs. 3-11.
- Morandi, S., Brasca, M., Andrighetto, C., Lombardi, A., Lodi, R. 2006. Technological and molecular characterization of enterococci isolated from north-west Italian Dairy products. International Dairy Journal. 16: p. 867-875.
- Moureaux, M.H., Bretey, J., and Roy, D. 1960. Thermo-resistance of *Mycobacterium tuberculosis*. Relation to its pathogenicity. Human, BCG, avian, paratuberculosis strain. Part I. Ann Inst Pasteur (Paris). 99: 421-432.
- Nauta, M. 2000. Separation of uncertainty and variability in quantitative microbial risk assessment models. International Journal of Food Microbiology. 57(1-2): 9-18.
- Nieto, G., Jongberg, S., Skibsted, L.H., Andersen, M.L. y Ros, G. 2013. Efecto de aceites esenciales y del envasado en atmósfera modificada en la oxidación proteica de hamburguesa de cerdo. VII Congreso CyTA (Libro de resúmenes). Córdoba. Comunicación oral O-11.
- Nikaido, H., and Vaara, M. 1985. Molecular basis of the permeability of the bacterial outer membrane. Microbiological Reviews. 49: 1-32.

- Nixon, P.A. 1971. Temperature integration as a means of assessing storage conditions. In Report on Quality in Fish Products; Seminar N° 3. Fishing Industry Board, Wellington, New Zealand, pp. 34-44.
- Noma, S., Kajiyama, D., Igura, N., Shimoda, M., Hayakawa, I. 2006. Mechanisms behind tailing in the pressure inactivation curve of a clinical isolate of *Escherichia coli* O157: H7. *International Journal of Food Microbiology*. 109 (1-2): 103-8.
- Nightingale, K. K., Thippareddi, H., Phebus, R. K., Marsden, J.L., Nutsch, A.L., 2006. Validation of a traditional Italian-style salami manufacturing process for control of *Salmonella* and *Listeria monocytogenes*. *Journal of Food Protection*. 69 (4): 794-800.
- Olafsson, G., Jägerstad, M., Öste, R., and Wesslén, B. 1993. Delamination of Polyethylene and Aluminium Foil Layers of Laminated Packaging Material by Acetic Acid. *Journal of Food Science*. January. Volume 58, Issue 1, pages 215-219.
- Olley, J., and Ratkowsky, D.A. 1973a. Temperature function integration and its importance in storage and distribution of flesh foods above the freezing point. *Food Technology in Australia*. 25: 66 – 73.
- Olley, J., and Ratkowsky, D.A. 1973b. The role of temperature integration on monitoring fish spoilage. *Food Technology*. New Zealand. 8 (2): 147-53.
- Ordóñez, J. A., Cambero, M^a. I., Fernández, L., García M^a. L., García de Fernando, G., De la Hoz, L. y Selgas, M^a. D. 1998. *Tecnología de los Alimentos*. Volumen I. Componentes de los Alimentos y Procesos. Proyecto Editorial Ciencias Químicas. Madrid, España.
- Ordóñez, A., García de Fernando, G. (eds.), Selgas, M^a. D., García, M^a. L., Cambero, M^a. I., Fernández, L., Fernández, M., Hierro, E. 2014. *Tecnología de los Alimentos de Origen Animal*. Volumen 1. Fundamentos de Química y Microbiología de los Alimentos. Editorial Síntesis. Pág. 462-492.
- Pagan, R., Condon, S., and Sala, F.J. 1997. Effects of several factors on the heat-shock-induced thermotolerance of *Listeria monocytogenes*. *Applied and Environmental Microbiology*. 63 (8): 3225-3232.
- Park, Y.K., Bearson, B., Bang, S.H., Bang, I.S., and Foster, J.W. 1996. Internal pH crisis, lysine decarboxylase and the acid tolerance response of *Salmonella typhimurium*. *Molecular Microbiology*. 20 (3): 605-11.
- Phan-Thanh, L., Mahouin, F., and Alige, S. 2000. Acid responses of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 55: 121-126.
- Pérez, R.F. 2006. Evaluación cuantitativa del riesgo microbiano en productos cárnicos cocidos: modelos de contaminación cruzada y su impacto sobre la gestión del riesgo. Memoria presentada para optar al grado de doctor por la Universidad de Córdoba (España). Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos.
- Pérez-Rodríguez, F., Valero, A., Todd, E.C., Carrasco, E., García-Gimeno, R.M., Zurera, G. 2007. Modelling transfer of *Escherichia coli* O157:H7 and *Staphylococcus aureus* during slicing of a cooked meat product. *Meat Sci*. 76 (4): 692-9.
- Pethybridge, A.D., Ison, R.W., and Harrigan, W.F. 1983. Dissociation constant of sorbic acid in water and water-glycerol mixtures at 25°C from conductance measurements. *International Journal of Food Science & Technology*. Volume 18, Issue 6, pages. 789-796.
- Pin, C., and Baranyi, J. 1998. Predictive models as means to quantify the interactions of spoilage organism. *International Journal of Food Microbiology*. 41(1): 59-72.
- Pin, C., Sutherland, J.P., and Baranyi, J. 1999. Validating predictive models of food spoilage organisms. *Journal of Applied Microbiology*. Oct. 87 (4): 491-499.

- Pin, C. 2004. From single cell observations to microbial population dynamics. Talk at 104th American Society for Microbiology Meeting. New Orleans, Louisiana, USA, 23-27 May 2004.
- Pin, C., and Baranyi, J. 2008. Single-cell and population lag times as a function of cell age. *Applied and Environmental Microbiology*. 74(8): 2534-6.
- Pirt, S.J. 1975. Principles of microbe and cell cultivation, John Wiley, New York.
- Poschet, F., and Van Impe, J.F. 1999. Quantifying the uncertainty of model outputs in predictive microbiology: a Monte Carlo analysis. *Med. Fac. Landbouwet. Universiteit Gent.*, 64 (5): 499-506.
- Poschet, F., Bernaerts, K., Geeraerd, A. H., Scheerlinck, N., Nicolaï, B.M., and Van Impe, J.F. 2004. Sensitivity analysis of microbial growth parameter distribution with respect to data quality and quantity by using Monte Carlo analysis. *Journal Mathematics and Computers in Simulation*. Volume 65 Issue 3, April 2004. Pages 231-243.
- Prescott, L.M., Harley, J.P., Klein, D.A. 1999. Microbiología. 4^a Edición. McGraw-Hill. Interamericana. p. 114 – 136.
- Presser, K.A., Ratkowsky, D.A., and Ross, T. 1997. Modelling the growth rate of *Escherichia coli* as a function of pH and lactic acid concentration. *Applied and Environmental Microbiology*. Jun; 63 (6): p. 2355-60.
- Presser, K.A., Ross, T., and Ratkowsky, D.A. 1998. Modelling the growth limits (growth/no growth interface) of *Escherichia coli* as a function of temperature, pH, lactic acid concentration, and water activity. *Applied and Environmental Microbiology*. May; 64 (5): 1773-9.
- Raevuori, M., Genigeorgis, C. 1975. Effect of pH and sodium chloride on growth of *Bacillus cereus* in laboratory media and certain foods. *Applied Microbiology*. Jan; 29 (1): 68-73.
- Ramos, A., Sánchez, P., Ferrer, J.M., Barquín, J., Linares, P. 2010. Modelos matemáticos de optimización, Escuela Técnica Superior de Ingeniería. Departamento de Organización Industrial. Universidad Pontificia Comillas: Journal Madrid Universidad de Comillas (España).
- Raso, J., Barbosa-Cánovas, G.V. 2003. Nonthermal preservation of foods using combined processing techniques. *Critical Reviews in Food Science and Nutrition*. 43(3): 265-85.
- Ratkowsky, D.A., Olley, J., McMeekin, T.A., and Ball, A. 1982. Relationship between temperature and growth rate of bacterial cultures. *Journal of Bacteriology*. 149 (1): 1-5.
- Ratkowsky, D.A., and Ross, T. 1995. Modelling the bacterial growth/no growth interface. *Letter of Applied Microbiology*. January. Volume 20 (1): 29-33.
- Real Decreto 348/2001 (4 de Abril del 2001). 2006. Por el que se regula la elaboración, comercialización e importación de productos alimenticios e ingredientes alimentarios tratados con radiaciones ionizantes.
- Rechinger, K.B., Siegmund, H. 2002. Rapid assessment of cell viability of *Lactobacillus delbrueckii* subsp. *bulgaricus* by measurement of intracellular pH in individual cells using fluorescence ratio imaging microscopy. In: *International Journal of Food Microbiology*, Vol. 75, No. 1-2: 53-60.
- Reglamento (CE) N° 2073/2005 de la Comisión de las Comunidades Europeas de 15 de Noviembre de 2005 relativo a los criterios microbiológicos aplicables a los productos alimenticios, ed. DO L 338 de 22 de Diciembre 2005. Pág. 1-33.
- Revista Alimentaria Investigación Tecnología y Seguridad. 2013. Especial monográfico (AESAI-Informa). Seguridad Alimentaria y Calidad. Tecnologías de la Información y la Comunicación (TIC). Abril 2013. N° 442. Impreso en España. Pág. 27-35.

- Riesenberg-Wilmes, M.R., Bearson, B., Foster, J.W., Curtis, R. 3rd. 1996. Role of the acid tolerance response in virulence of *Salmonella typhimurium*. *Infection and Immunity*. Apr; 64 (4): 1085-92.
- Roberts, T.A., Gibson, A.M., and Robinson, A. 1981. Prediction of toxin production by *Clostridium botulinum* in pasteurized pork slurry. *J. Food Technol.* 16: 337-55.
- Roberts, T.A., Jarvis, B. 1983. Predictive modelling of food safety with particular reference to *Clostridium botulinum* in model cured meat systems. *Society of Applied Bacteriology Symposium Ser.* 11: 85-95.
- Roberts, T. 1994. Control microbiológico de la producción de alimentos. Cap.9, 178-182. En. Eley, R., eds. *Intoxicaciones alimentarias de etiología microbiana*. Acribia. Zaragoza.
- Roberts, T.A. 1995. Microbial growth and survival: developments in predictive modelling. *International biodeterioration & biodegradation*. 36 (3-4): 297-309.
- Robinson, T.P., Ocio, M.J., Kaloti, A., Mackey, B.M. 1998. The effect of the growth environment on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology* 44 (1-2): 83-92.
- Robinson, T.P., Aboaba, O.O., Kaloti, A., Ocio, M.J., Baranyi, J., Mackey, B.M. 2001. The effect of inoculum size on the lag phase of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 70 (1-2): 163-73.
- Rodriguez-Palenzuela. 2011. Los ácidos orgánicos como agentes antimicrobianos. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Madrid. XVI Curso de especialización FEDNA.
- Rodriguez Pérez, M. 2003. Desarrollo y Validación de modelos matemáticos para la predicción de vida comercial en productos cárnicos. Memoria presentada para optar al grado de doctor por el Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba (España). Facultad de Veterinaria. Pág. 274. Departamento de Biotecnología. Universidad Politécnica de Madrid. XVI Curso de especializaciones FEDNA.
- Roe, A.J., O'Byrne, C., McLaggan, D. and Booth, I.R. 2002. Inhibition of *Escherichia coli* growth of acetic acid: a problem with methionine biosynthesis and homocysteine toxicity. *Microbiology*. Jul; 148 (Pt 7): 2215-22.
- Rouse, J., Rolow, A., Nelson, C.E. 1988. Effect of chemical treatment of poultry feed on survival of *Salmonella*. *Poultry Science*. Aug; 67 (8): p. 1225-8.
- Rocourt, J., Boerlin, P., Grimont, F., Jacket, C., and Piffaretti, J.C. 1992. Assignement of *Listeria grayi* and *Listeria murrayi* to a single species, *Listeria grayi*, with a revised description of *Listeria grayi*. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 42: 171-174. 460.
- Ross, T., and McMeekin, T.A. 1995. Predictive microbiology and HACCP. En: *Advances in Meat Research: HACCP in Meat, Poultry and Fish Processing* 10, Chapman and Hall, UK, pp. 330-357.
- Ross, T. 1996. Indices for performance evaluation of predictive models in food microbiology. *Journal of Applied Microbiology*. Nov; 81 (5): p. 501-508.
- Ross, T., Dalgaard, P., Tienungoon, S. 2000. Predictive modelling of the growth and survival of *Listeria* in fishery products. *International Journal of Food Microbiology*. Dec 20; 62 (3): 231-45.
- Rowan, N.J., & Anderson, J.G. 1998. Diarrhoeal enterotoxin production by psychotropic *Bacillus cereus* present in reconstituted milk-based infant formulae (MIF). *Letters in Applied Microbiology*, 26 (2): 161-165.
- Russell, A.D. 1991. Mechanisms of bacterial resistance to non-antibiotics: food additives and food and pharmaceutical preservatives. *Journal of Applied Bacteriology*. Sep; 71 (3): 191-201.

- Russell, D.G. 2001. Mycobacterium tuberculosis: here today and here tomorrow. *Nature Reviews Molecular Cell Biology*. Aug; 2 (8): 569-77.
- Ryan, K.J., Ray, C.G. (editors) 2004. SHERRIS Medical Microbiology. An Introduction to Infectious Diseases. Fourth Edition. McGraw-Hill. Medical Publishing Division.
- Salmond, C.V., Kroll, R., and Booth, I.R. 1984. The effect of food preservatives on pH homeostasis in *Escherichia coli*. *Journal of General Microbiology*. Nov; 130 (11): 2845-50.
- Samelis, J., Sofos, J.N., Kendall, P.A., and Smith, G.C. 2002. Effect of acid adaptation on survival of *Escherichia coli* O157:H7 in meat decontamination washing fluids and potential effects of organic acids interventions on the microbial ecology of the meat plant environment. *Journal of Food Protection*, 65: 33-40.
- Samelis, J., Ikeda, J.S., and Sofos, J.N. 2003. Evaluation of the pH-dependent, stationary-phase acid tolerance in *Listeria monocytogenes* and *Salmonella* Typhimurium DT104 induced by culturing in media with 1% glucose: a comparative study with *Escherichia coli* O157:H7. *Journal of Applied Microbiology*. 95: 563-575.
- Saxe, S., and Revzin, A. 1979. Cooperative binding to DNA of catabolite activator protein of *Escherichia coli*. *Biochemistry* 18: 255-263.
- Sinensky, M. 1974. Homeoviscous adaptation – a homeostatic process that regulates the viscosity of membrane lipids in *Escherichia coli*. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 71 (2): 522-5.
- Schleifer, K.H., and Kilpper-Bälz, R. 1984. Transfer of *Streptococcus faecalis* and *Streptococcus faecium* to the Genus *Enterococcus* nom. rev. as *Enterococcus faecalis* comb. nov. and *Enterococcus faecium* comb. nov. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 34 (1): 31- 34.
- Shöne, N. 2011. A new probabilistic approach in predictive microbiology. In *Molecular Bioinformatics*. Goethe Universität Frankfurt: Frankfurt, Alemania.
- Smith, M.G. 1985. The generation time, lag time, and minimum temperature growth of coliform organism on meat, and the implications for codes of practice in abattoirs. *Journal of Hygiene (Lond)*. 94 (3): 289-300.
- Smulders, F.J., and Greer, G.G. 1998. Integrating microbial decontamination with organic acids in HACCP programmes for muscle foods: prospects and controversies. *International Journal of Food Microbiology*. 44 (3): 149-169.
- Spencer, R., and Baines, C.R. 1964. The effect of temperature on the spoilage of wet fish: I. Storage at constant temperature between -1°C and 25°C. *Food Technology Champaign* 18: 769-772.
- Spiegel, M.R. 1995. *Teoría y Problemas de estadística*. 2da Edición. McGraw-Hill. Buenos Aires
- Stanier, R.Y., Ingraham, J.L., Wheelis, M.L. y Painter, P.R. 1989. *Microbiología* 2 Ed. Ed. Reverté. Pág. 195-209.
- Stephens, P.J., Jojnsen, J.A., Davies, K.W., Holbrook, R., Lappin-Scott, H.M., Humphrey, T.J. 1997. The use of an automated growth analyser to measure recovery times of single heat-injured *Salmonella* cells. *Journal of Applied Microbiology*. 83 (4): 445-55.
- Stopforth, J.D., Samelis, J., Sofos, J.N., Kendall, P.A., and Smith, G.C. 2003. Influence of organic acid concentration on survival of *Listeria monocytogenes* and *Escherichia coli* O157:H7 in beef carcass wash water and on model equipment surfaces. *Food Microbiology*. 20: p. 651-660.
- Stratford, M., and Anslow, P.A. 1996. Comparison of the inhibitory action on *Saccharomyces cerevisiae* of weak-acid preservatives, uncouplers, and medium-chain fatty acids. *FEMS Microbiology Letters*. 142 (1): 53-58.

- Stuart, S.E., and Welshimer, H.J. 1973. Intrageneric relatedness of *Listeria* Pirie. *International Journal of Systematic Bacteriology*. 23: 8-14.
- Sofos, J.N., & Busta, F.F. 1993. Sorbic and sorbates. In: *Antimicrobials in Foods* ed. Davidson, G.A. New York: Marcel Dekker. pp. 49-94.
- Sofos, J.N., and Smith, G.C. 1998. Nonacid meat decontamination technologies: Model studies and commercial applications. *International Journal of Food Microbiology*. 44 (3): 171-188.
- Sun, A.N., Camilli, A., and Portnoy, D.A. 1990. Isolation of *Listeria monocytogenes* small plaque mutants defective for intracellular growth and cell-to-cell spread. *Infection and Immunity*. 58: 3770-3778.
- Sutherland, J., Bayliss, A. 1994. Predictive modelling of growth of *Yersinia enterocolitica*: the effects of temperature, pH and sodium chloride. *International Journal of Food Microbiology*. Feb; 21 (3): 197-215.
- Swanson, J. A., and Baer, S.C. 1995. Phagocytosis by zippers and triggers. *Trends Cell Biology*. 5: 89-93.
- Swinnen, I.A., Bernaerts, K., Dens, E.J., Geeraerd, A.H., Van Impe, J.F. 2004. Predictive modelling of the microbial lag phase: a review. *International Journal of Food Microbiology*. Jul 15; 94 (2): 137-159.
- Tamplin, M.L. 2005. Inactivation of *Escherichia coli* O157: H7 in simulated human gastric fluid. *Applied and Environmental Microbiology*. Jan; 71 (1): 320-5.
- te Giffel, M.C., & Zwietering, M.H. 1999. Validation of predictive models describing the growth of *Listeria monocytogenes*. *International Journal of Food Microbiology*. 46: 135-149.
- Theron, M.M., Rykers Lues, J.F. 2010. *Organic acids and food preservation*. 1st Edition. Publisher CRC Press, 1 edition (September 16) Taylor & Francis Group. Printed in the United States of America. p. 198- 219.
- Valero, A. 2006. Aplicaciones y modelos predictivos en evaluación de riesgo de *Listeria monocytogenes* en alimentos mínimamente procesados. Memoria presentada para optar al grado de doctor por el Departamento de Bromatología y Tecnología de los Alimentos de la Universidad de Córdoba (España)
- van Boekel, M.A. 1996. Statistical aspects of kinetics modelling for food science problems. *Journal of Food Science*. 61 (3): 477-489.
- van Boekel, M.A. 2002. On the use of the Weibull model to describe thermal inactivation of microbial vegetative cells. *International Journal of Food Microbiology*. 74: 139-159.
- Vancanneyt, M., Lombardi, A., Andrighetto, C., Knijff, E., Torriani, S., Bjorkroth, K.J., Franz, C.M., Foulquié Moreno, M.R., Revets, H., De Vuyst, L., Swings, J., Kersters, K., Dellaglio, F., Holzapfel, W.H. 2002. Intraspecies genomic groups in *Enterococcus faecium* and their correlation with origin and pathogenicity. *Applied and Environmental Microbiology*, 68: 1381-1391.
- Van Impe, J.F., Nicolaï, B.M., Martens, T., De Baerdemaeker, J., and Vandewalle, J. 1992. Dynamic mathematical model to predictive microbial growth and inactivation during food processing. *Applied and Environmental Microbiology*. Sep; 58 (9): 2901-2909.
- Van Impe, J.F., Versyck, K.J., Geeraerd, A.H. 1999. Validation of predictive models: definitions and concepts. Cost - 914: Predictive modelling of microbial growth and survival in foods- Workshop on Modelling Microbial (Working Group 4- Modelling microbial survival to eliminate pathogens from foods). Roberts T. (eds.) Budapest (Hungary), August 26, 1996 Office for Official Publications of the European Communities, Luxembourg pages: 31-38

- Vereecken, K., Bernaerts, K., Boelen, T., Dens, E., Geeraerd, K., Versyck, K., and Van Impe, J. 1998. State of the art in predictive food microbiology. Med. Fac. Landbouw. Univ. Gent, 66, 13-19.
- Vereecken, K.M., and Van Impe, J.F. 2002. Analysis and practical implementation of a model for combined growth and metabolite production of lactic acid bacteria. Int. J. Food Microbiol. 73 (2-3): 239-250.
- Vialette, M., Pinon, A., Chasseignaux, E., Lange, M. 2003. Growth kinetics comparison of clinical and seafood *Listeria monocytogenes* isolates in acid and osmotic environment. International Journal of Food Microbiology. Volume 82, Issue 2, April; 121-131.
- Vose, D. 2008. Risk Analysis: A Quantitative Guide. Third Edition. John Wiley & Sons, Ltd. British Library Cataloguing in Publication Data. pp. 47.
- Walker, S.J., Archer, P., Banks, J.G. 1990. Growth of *Listeria monocytogenes* at refrigeration temperatures. Journal of Applied Bacteriology. Feb; 68 (2): 157-62.
- Waterman, S.R., and Small, P.L.C. 1998. Acid-Sensitive Enteric Pathogens Are Protected from Killing under Extremely Acidic Conditions of pH 2.5 when They Are Inoculated onto Certain Solid Food Sources. Applied and Environmental Microbiology. Oct; 64 (10): 3882-3886.
- Wilde, S., Jorgensen, F., Campbell, A., Rowbury, R., and Humphrey, T. 2000. Growth of *Salmonella enterica* Serovar Enteritidis PT4 in media containing glucose results in enhance RpoS-independent heat and acid tolerance but does not affect the ability to survive air-drying on surfaces. Food Microbiology. 17: p. 679-686.
- Wilson, P.D.G. 2000. Microbial modelling in structured foods. In: Van Impe, J.F.M., Bernaerts, K. (Eds.), Predictive Modelling in Foods-Conference Proceedings. KULeuven/BioTeC, Belgium. Pp 224-225 (IBN 90-804818-3-1).
- Wimpenny, J.W., Leistner, L., Thomas, L.V. Mitchell, A.J., Katsaras, K., Peetz, P. 1995. Submerged bacterial colonies within food and model systems: their growth, distribution and interactions. International Journal of Food Microbiology. Dec; 28 (2): 299-315.
- Whiting, R. C., and Buchanan, R. 1993. A classification of models in predictive microbiology -a reply to K R Davey. Food Microbiology. 10: 175-177.
- Whiting, R.C., and Buchanan, R. 1994. Microbial modelling. Food Technology. 48: 113-120.
- Whiting, R.C., & Bagi. L.K. 2002. Modelling the lag phase of *Listeria monocytogenes*. International Journal of Food Microbiology. 73: 291-295
- Young, K.M., Foegeding, P.M. 1993. Acetic, lactic and citric acids and pH inhibition of *Listeria monocytogenes* Scott A and the effect on intracellular pH. J. Appl. Bacterial. 74 (5): 515-20.
- Yuk, H.G., and Schneider, K.R. 2006. Adaptation of *Salmonella* spp. in juice stored under refrigerated and room temperature enhances acid resistance to simulated gastric fluid. Food Microbiology. Oct; 23 (7): 694-700.
- Zhao, T., Doyle, M.P., Wang, G. 1994. Emerging pathogens and rapid detection methods: *Escherichia coli*, *Salmonella*, *Vibrio cholerae*, p. 386-403. In proceeding of the 2nd Asian Conference of Food Safety. International life Science Institute, Washington, D.C.
- Zhao, L., Montville, T.J., Schaffner, D. W. 2002. Time-to-detection, percent-growth-positive and maximum growth rate models for *Clostridium botulinum* 56A at multiple temperatures. International Journal of Food Microbiology. Aug. 77 (3): 187-197.
- Zurera-Cosano, G., Castillejo-Rodríguez, A.M., García-Gimeno, R.M., & Rincón-León, F. 2004. Response surface vs. Davey model for estimation of *Staphylococcus aureus* growth under different experimental conditions. Journal of Food Protection. 67, 1138-1145.

- Zurera-Cosano, G., García-Gimeno, R.M., Rodríguez-Pérez, R., Hervás-Martínez, C. 2006. Performance of response surface model for prediction of *Leuconostoc mesenteroides* growth parameters under different experimental conditions. Food Control. 17 (6): 429-438.
- Zwietering, M.H., Jongenburger, I., Rombouts, F.M., Van't Reit, K. 1990. Modelling of bacterial growth curve. Applied and Environmental Microbiology. 56: 1875-1881.
- Zwietering, M.H., Rombouts, F.M., Van't Riet, K. 1993. Some aspects of modelling microbial quality of food. Food Control. 4: 89-96.
- Zwietering, M.H., De Wit, J.C., Cuppers, H.G., Van't Riet, K. 1994. Modelling of bacterial growth with shifts in temperature. Applied and Environmental Microbiology. 60: 204-213.